

14
TESIS/
2893



FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**EFFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES MASCULINAS EN LA
RESPUESTA VASOMOTORA INDUCIDA POR ESTIMULACIÓN
ELÉCTRICA Y ACETILCOLINA EN ARTERIA MESENTÉRICA DE
RATA. PAPEL DE LA PROTEÍNA KINASA C.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA MADRID
REGISTRO GENERAL

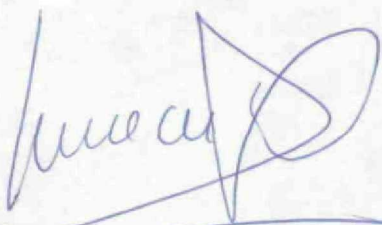
Entrada 01 Nº. 200600003662
14/03/06 16:07:12

Javier Blanco Rivero
Madrid, 2006


Reg. F.M. 26.028



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de sobresaliente cum laude
Madrid, 22 de junio de 2006


D. de la Cruz



Lorté 





Mercedes Ferrer Parra, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que D. Javier Blanco Rivero ha realizado bajo su dirección el trabajo **“Efecto de las hormonas sexuales masculinas en la respuesta vasomotora inducida por estimulación eléctrica y acetilcolina en arteria mesentérica de rata. Papel de la proteína kinasa C”** como Tesis para alcanzar el Grado de Doctor.

Madrid, a 13 de Marzo de 2006

Fdo.: Dra. Mercedes Ferrer Parra

A mis padres José Luis y María Jesús

A mi hermana Amaya

Al resto de mi familia, por apoyarme
en todo momento

Este trabajo ha sido subvencionado por el Insituto de
Salud Carlos III (Proyecto nº PI- 020335).

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la directora de esta Tesis Doctoral, Dra. Mercedes Ferrer Parra, sin la cual este trabajo no habría sido posible, por la confianza que ha depositado en mí, por la dedicación y consejos que me ha prodigado durante la realización del presente estudio, su paciencia, por guiarme y enseñarme a querer este duro mundo de la investigación.

A la Dra. Gloria Balfagón, por la ayuda y la confianza que me ha brindado al permitirme colaborar en varios de sus proyectos, y haber dedicado también parte de su tiempo a enseñarme y compartir toda su experiencia conmigo.

A mis compañeros del laboratorio, especialmente a Carmen, por sus consejos profesionales y personales a la hora del café, a Iván por abrirme la mente y hacerme ver que cualquier investigación básica tiene su aplicación médica, a Rocío (mi niña pesada) por dedicarme su sonrisa cada mañana al llegar y ofrecerme su amistad, a Rosa, Ana y Verónica, por escucharme y echarme una mano cada vez que lo he necesitado.

A M^a Esther Martínez por su ayuda a nivel administrativo, y al resto de miembros del Departamento, en especial al resto de becarios de otros grupos, Adely, Ana y Fátima.

A los responsables de los servicios que he utilizado durante la estancia en esta Universidad: a la directora del animalario, la Dra. Carmina Fernández.Criado y su equipo, por el mantenimiento de los animales; la Dra. Ana Guadaño y su grupo de investigación, por sus consejos y ayuda prestada a nivel histológico; a las técnicas del confocal M^a Dolores Morales y Lucía Sánchez; a la directora del Servicio de Protección Radiológica, M^a Teresa Macías y su equipo, y a Eva García Santos, técnico del Servicio de Patología Experimental, por la inestimable ayuda prestada a la hora de realizar los experimentos oportunos para la realización o no de este trabajo.

No puedo dejar de mencionar a mis compañeros de otros laboratorios: las chicas del grupo dirigido por la Dra. Mercedes Salaíces, Amada, Ana, Ana "Bri", Marta, Patri, Raquel y Yoli, y las chicas del B-15, Cristina, Mayte y Elvira, , por todos los consejos

a nivel técnico que me han prestado durante todo este tiempo, y por las confidencias y charlas personales que hemos mantenido.

A mis niñas del cole, Diana, Elena y Tatiana, porque a pesar de llevar tantos años juntos (desde los cuatro añitos!!!) seguimos manteniendo la misma amistad desde el principio, y a pesar de vernos poco saben que las quiero muchísimo.

A mis compañeros de piso, Carmen, Luís, Jose, María y Néstor, por estar ahí siendo mi segunda familia todos los días y tener siempre la puerta abierta a compartir

A mis amigos de la carrera, Abraham, Alfredo, Antonio, Cynthia, Gerardo, Helena, Irene, Mario, Marta, Miguel, Mónica y Rocío; a Clara, Diego, Elena, María, Óscar y Yurena, por todas las horas de clases y prácticas, comidas en la cafetería, y por seguir todavía formando parte de mi vida.

A Dani, Diana, Isa, Laura, Noelia y Sergio por todas las excursiones, comidas y fiestas que hemos compartido durante tantos años, y que sean muchas más. A Paco, Ramón y Roberto, y a las pupis, especialmente a Alba, Álex, Agus, Lucía, Marta, María, Nahuel y Víctor, por acogerme y tratarme como uno más en sus grupos.

A mis amigos de Bilbao, Carola, Jasone, Mikel y Shingo, a los cuales no veo tanto como quisiera por imposibilidades geográficas, pero menos mal que las nuevas tecnologías nos unen.... A Alain, Álex, Anita, Germán, Hugo, Javi, Jose, Pablo y Sara, por leer cada noche todos mis pensamientos durante tanto tiempo. A todos ellos, porque a pesar de tenerlos lejos os siento muy cerca de mí.

Este trabajo también va dedicado a mi familia, o sea, a mi abuela Nieves; a mis primos Blanca y Javi, Alexia y Fernando y Arantxa y Dani; a sus (mis) niños Haritza, Ion, Alexia y Aitana, Irune y Eneko, que son la alegría de la familia; a mi tía Gloria y a mi tío José Luís, por darme su cariño. También a mi abuelo Joaquín y a mi abuela Consuelo, que a pesar de no seguir con nosotros siguen siendo parte importante de nuestras vidas.

Dejo para el final a los más importantes, a mis padres José Luís y María Jesús, y a mi hermana Amaya, por la paciencia que han tenido conmigo, por educarme como lo han hecho, por todo y por siempre.

Índice

INTRODUCCIÓN

1. Estructura y función de la pared arterial.....	1
1.a. Túnica íntima.....	2
• Factores vasodilatadores.....	3
- Óxido nítrico.....	3
- Prostaciclina.....	10
- Factor hiperpolarizante dependiente de endotelio.....	14
• Factores vasoconstrictores.....	15
- Endotelina.....	15
- Tromboxano A ₂	16
- Isoprostanos.....	18
• Especies reactivas de oxígeno.....	18
• Factores de crecimiento.....	23
1.b. Túnica Media.....	24
• Mecanismo de contracción del músculo liso vascular.....	25
1.c. Túnica adventicia.....	25
• Inervación adrenérgica.....	26
• Inervación sensitiva.....	29
• Inervación nitrérgica.....	30
2. Proteína quinasa C.....	30
3. Hormonas sexuales masculinas.....	33
3.a. Síntesis y mecanismo de acción de las hormonas sexuales masculinas.....	33
3.b. Efectos de la testosterona sobre la función vascular.....	37
• Efectos vasodilatadores de los andrógenos.....	40
• Efectos vasoconstrictores de los andrógenos.....	42
OBJETIVOS.....	47

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Mantenimiento de animales y protocolos.....	48
2. Ensayo de actividad PKC.....	48
3. Reactividad vascular.....	50
3.a. Participación del NO neuronal en la respuesta vasomotora.....	51

3.b. Participación del NO endotelial en la respuesta vasomotora.....	53
3.c. Participación de la PKC sobre la función del NO neuronal y endotelial.....	53
4. Liberación de NO.....	54
5. Liberación de ³ H-NA.....	56
6. Determinación de cGMP.....	57
7. Detección de aniones superóxido.....	58
8. Detección de peroxinitritos.....	59
9. Detección de nNOS, eNOS y TXA ₂ sintasa.....	59
9.a. Preparación de muestras.....	59
9.b. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	60
9.c. Electrotransferencia y detección inmunológica.....	60
10. Detección inmunohistoquímica de TXA ₂ sintasa.....	61
11. Producción de TXA ₂	62
12. Productos químicos.....	63
13. Análisis estadístico.....	63

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre:

1. Presión arterial.....	65
2. Respuesta a KCl.....	65
3. Inervación de la arteria mesentérica.....	66
3.a. Inervación adrenérgica.....	68
3.b. Inervación sensitiva.....	70
3.c. Inervación nitrérgica.....	71
• Expresión de nNOS.....	72
• Liberación de NO neuronal.....	73
• Participación de las hormonas sexuales masculinas sobre la ruta de señalización del NO/cGMP.....	74
- Respuesta a SNP.....	75
- Respuesta a 8-Br-cGMP.....	76
- Formación de cGMP.....	77
• Participación de las especies reactivas de oxígeno en la respuesta a NO.....	78
- Aniones superóxido.....	78
- Peroxinitritos.....	80
4. Actividad PKC.....	85

5. Acción de la PKC sobre la liberación y función del NO neuronal.....	88
6. Participación del NO endotelial en la respuesta inducida por ACh.....	96
6.a. Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de eNOS.....	97
6.b. Liberación de NO endotelial.....	98
6.c. Efecto del NO endotelial.....	99
6.d. Participación del TXA ₂	102
7. Acción de la PKC sobre la respuesta a NO endotelial.....	107
7.a. Efecto de la PKC sobre la liberación de NO endotelial.....	107
7.b. Participación de PKC sobre la acción vasomotora del NO endotelial.....	110
 CONCLUSIONES.....	 114
 BIBLIOGRAFÍA.....	 115

ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO



8-Br-cGMP: 8-bromo-GMP cíclico

AC: Adenilato ciclase

Ach: Acetilcolina

Ang II: Angiotensina II

ADP: Adenosín difosfato

AMT: 2-amino-5, 6- dihidro- 6- metil – 4H-1, 3- tiacina

ATP: Adenosín trifosfato

BK: Bradiquinina

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

cGMP: Guanosín monofosfato cíclico

CO₂: Dióxido de carbono

COX: Ciclooxygenasa

DAF2: 4, 5- diaminofluoresceína

DAF-2 DA: 4, 5- diaminofluoresceína diacetato

DAF-2T: Triazolofluoresceína

DAG: Diacilglicerol

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DHT: Dihidrotestosterona

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECE: Enzima convertidora de Endotelina

EDHF: Factor hiperpolarizante dependiente de endotelio

EE: Estimulación Eléctrica

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ET: Endotelina

FSH: Hormona folículo estimulante

GC: Guanilato ciclase

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámica

GSH: Glutation

GTP: Guanosín trifosfato

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HE: Hidroetidina

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IP₃: Inositol - 1, 4, 5- trifosfato

KHS: KREBS-Henseleit

L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil ester

LH: Hormona luteinizante

MAPK: MAP quinasa

MLCK: Quinasa de la cadena ligera de la miosina

NA: Noradrenalina

NF-κB: Factor nuclear κB

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NO: Óxido nítrico

NPY: Neuropeptido Y

O₂^{•-}: Aniones superóxido

OH[•]: Radicales hidroxilo

ONOO[•]: Peroxinitrito

ONOOH: Ácido peroxinitroso

PDBu: 12, 13 Forbol dibutirato

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PG: Prostaglandina

PGI₂: Prostaciclina

Phe: Fenilefrina

PIP₂: Fosfatidil inositol - 4, 5- bifosfato

PKA: Proteína kinasa A

PKC: Proteína kinasa C

PKG: Proteína kinasa G

PL: Fosfolipasa

PVDF: Difluoruro de polivinilideno

sGC: GC soluble

SNP: Nitroprusiato sódico

SOD: Superóxido dismutasa

TGF-β: Factor de crecimiento tumoral β

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

TTX: Tetrodotoxina

TXA₂: Tromboxano A₂

TXB₂: Tromboxano B₂

Tyron: Ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benceno-disulfónico

Introducción

1. Estructura y función de la pared arterial

La pared arterial contribuye al mantenimiento de la homeostasis vascular, ya que responde activamente a determinados estímulos, por lo que es importante conocer la organización de la pared arterial. Está formada por diferentes capas de tejido más o menos definidas. A medida que disminuye el calibre de los vasos, estas capas van adelgazando y algunas desaparecen. De modo general, en los vasos arteriales se observan tres capas concéntricas: túnica íntima, túnica media y túnica adventicia (Figura 1).

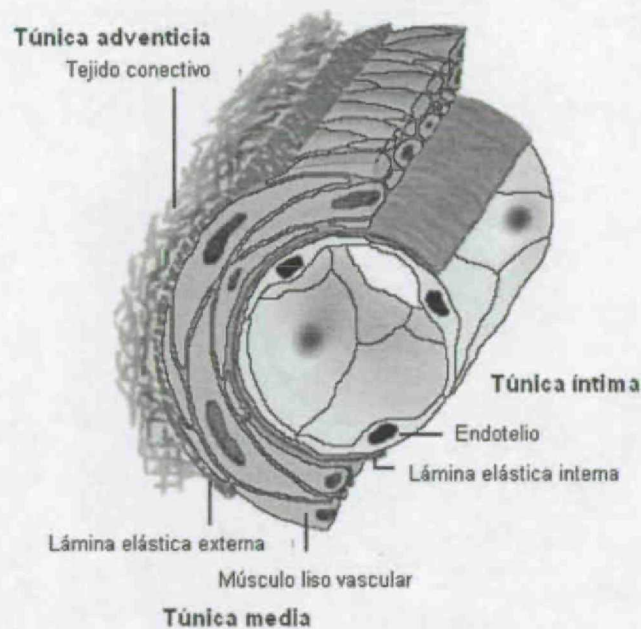


Figura 1: Estructura general de la pared arterial (Tomado de <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140>)

1. a Túnica íntima

La túnica íntima presenta una capa de células endoteliales revistiendo la superficie interna del vaso. Esta capa de células descansa sobre la capa subendotelial, formada por tejido conjuntivo laxo muy delicado, que en ocasiones puede presentar células musculares dispersas. Presenta también una lámina limitante elástica interna, tubular y perforada por uniones en hendidura, que la separa de la túnica media, lo que permite la difusión de nutrientes de la sangre por los orificios para nutrir las células de la pared arterial.

Las células endoteliales no sólo constituyen una barrera mecánica entre la sangre y la pared, sino que es uno de los principales órganos de regulación vascular. Su posición anatómica le permite actuar como receptor y transmisor de señales entre la sangre y la pared (Lüscher y Vanhoutte, 1990). Posee acciones exocrina, paracrina y autocrina, y está implicado en la liberación de agentes vasoactivos, en la respuesta inmune, en el control de la proliferación del músculo liso subyacente y en la adhesión y extravasación de los leucocitos (Lüscher y Vanhoutte, 1990; Rubanyi y Botelho, 1991).

En respuesta a distintos estímulos, el endotelio es capaz de liberar distintos agentes:

- Vasodilatadores, como óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), etc.
- Vasoconstrictores, como endotelina 1 (ET-1), angiotensina II (Ang II), tromboxano A_2 (TXA_2), isoprostanos, etc.
- Especies reactivas de oxígeno, como aniones superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), etc.
- Factores de crecimiento, como factor de crecimiento tumoral (TGF)- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de necrosis tumoral (TNF)- α , etc.
- Interleuquinas y quimioquinas.

Se sabe que las células endoteliales son sensibles a cambios hemodinámicos, y que la acción combinada de los factores liberados mantiene la homeostasis vascular, al igual que el desequilibrio de los mismos participa en diversas patologías cardiovasculares (Lüscher y Vanhoutte, 1990, Boak y Chin-Dusting, 2004; Daugherty y Cassis, 2004).

▪ Factores vasodilatadores

- Óxido nítrico (NO)

El NO es un mediador ubicuo de la célula, que juega un papel central en todos los sistemas del organismo, ya que modula el flujo sanguíneo, mecanismos de homeostasis, y procesos de proliferación (Tao y col., 2006) y diferenciación celular (Kawahara y col., 2005). Es muy útil como mensajero intracelular, ya que es capaz de difundir rápidamente a través de la mayoría de células y tejidos (Lancaster, 1994; Wood y Garthwaite, 1994). Esta rápida difusión es crucial para entender su actividad biológica y permite una rápida suma de la producción de NO por parte de diversas células en una región local. Esta difusión se debe en gran parte a los eritrocitos.

Desde el punto de vista químico, el NO es una molécula neutra, que tiene un electrón desapareado, lo cuál hace que se le pueda considerar un radical libre, y que sólo pueda reaccionar con moléculas con un electrón desapareado, es decir, con otros radicales libres y con metales de transición. Surge de la oxidación enzimática de un N guanidino del aminoácido L-arginina, pudiendo seguir tres rutas una vez sintetizado (Figura 2):

1. Activación de la guanilato ciclasa (GC), responsable de los efectos fisiológicos del NO.

2. Reacción con la oxihemoglobina, para así formar el metabolito oxidativo estable nitrato (Doyle y Hoekstra, 1981; Goretski y Hollocher, 1988).
3. Transformación en peroxinitrito (ONOO^-) por reacción con O_2^- , y como consecuencia nitrosilación de proteínas, efecto responsable de la mayoría de los efectos fisiopatológicos del NO.

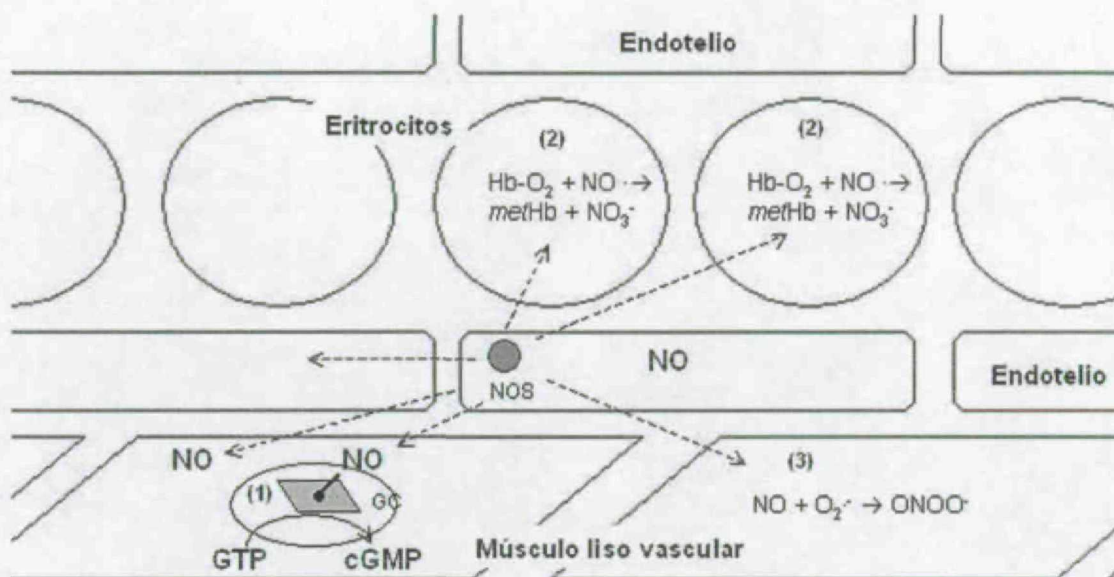
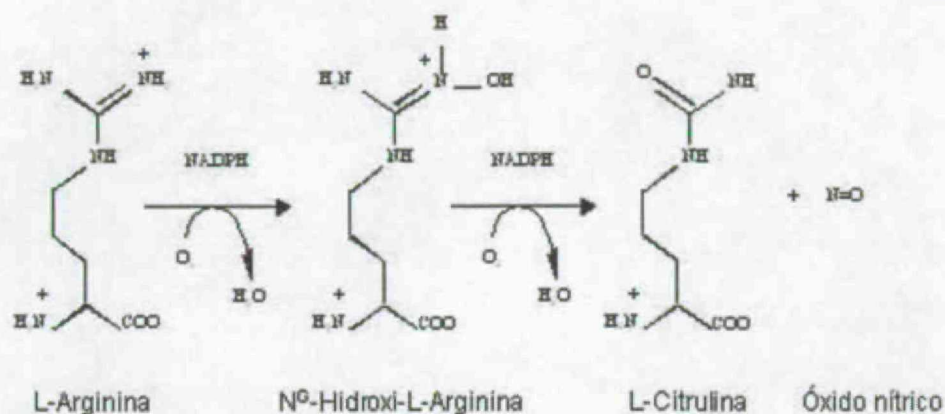


Figura 2: Reacciones principales que sufre el óxido nítrico en el tejido vascular: activación de la guanilato ciclasa (1), reacción con la oxihemoglobina (2) y transformación en ONOO^- (3) (Modificado de Beckman y Koppenoll, 1996)

El NO se sintetiza por la acción de la NO sintasa, que utiliza como sustrato la L-arginina, liberando como productos L-citrulina y NO.



La NO sintasa tiene tres isoformas distintas:

- **Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, NOS III)**, (Lamas, 1992), presente de forma constitutiva en las células endoteliales. Es una enzima unida a membrana específicamente en las caveolas (Michel y Feron, 1997). A pesar de que el Ca^{2+} es considerado como el estímulo más importante de la actividad eNOS, posee múltiples mecanismos de regulación independientes de Ca^{2+} , entre ellos fosforilación y defosforilación de distintos aminoácidos (Govers y Rabelink, 2001). Se puede estimular de forma farmacológica, mediante sustancias vasoactivas dependientes de endotelio, como la acetilcolina (Ach) y la bradiquinina (BK), que se unen a receptores de membrana acoplados a proteínas G que activan procesos de incremento de Ca^{2+} intracelular, uniéndose a la calmodulina o activando diversos procesos de fosforilación (Schulz y col., 1992). También se puede activar debido a estrés por fuerzas de cizallamiento, producidas por el flujo sanguíneo. Esta forma de activación es poco conocida, aunque se propone que estas fuerzas se transmiten a las caveolas a través del citoesqueleto (Davies, 1995) a través de proteínas G (Gudi y col., 1996).

- **Óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS, NOS I)**, es una enzima citosólica presente principalmente en el sistema nervioso, liberando NO que desempeña el papel de neurotransmisor (Wiklund y col., 1997). Además se puede encontrar en tejidos de interés para el sistema cardiovascular, como los nervios perivasculares (Ayajiki y col., 2002), el retículo sarcoplásmico de células del músculo liso vascular (Xu y col., 1999), y en cardiomiocitos (Planitzer y col., 2002; Miethke y col., 2003).

Tanto eNOS como nNOS son enzimas constitutivas dependientes de Ca^{2+} , que catalizan la oxidación de cinco electrones de L-arginina a NO y L-citrulina, utilizando como donador de electrones el nucleótido NADPH. Estas enzimas requieren la presencia de calmodulina para proporcionar Ca^{2+} , y de cuatro cofactores distintos: Fe hemo, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina (BH_4). Liberan NO en el rango de 50 –500 nM (Beckman y Koppenol, 1996; Pinsky y col., 1997).

- **Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS II)**, enzima inducible independiente de calcio, que requiere de síntesis *de novo* desencadenada por diversas citoquinas y endotoxinas mediante activación del factor nuclear κB (NF- κB) entre otros (Sheehan y col., 2002). Se libera principalmente en situaciones patológicas por las células endoteliales (Radomski y col., 1990) y del músculo liso vascular (Fleming y col., 1991). Su activación requiere los mismos cofactores que las otras dos isoenzimas, con la diferencia de que, a pesar de poseer un sitio de unión a calmodulina, puede actuar a concentraciones de calcio muy por debajo de las fisiológicas (Hobbs y col., 1999). Como esta isoforma es inducida en presencia de toxinas, desempeña un papel muy importante en el proceso de shock séptico (Nava y col., 1991), proceso que se produce cuando una infección arrolladora lleva a que se

presente disminución del flujo sanguíneo, disfunción general de órganos y daño tisular (Feihl y col., 2001). Su nivel de liberación de NO es mucho más alto que en el caso de las otras dos isoformas de NOS (Nava y Salazar, 1997).

Además, se ha descrito una NOS en la mitocondria (mtNOS) que produce NO, el cual podría actuar como una señal de comunicación intracelular, y, por tanto, jugaría un importante papel en la respiración mitocondrial. La estimulación de mtNOS induce liberación de citocromo c y aumento de la peroxidación lipídica (Drew y Leeuwenburgh, 2002). La isoforma mtNOS no está bien caracterizada, y mientras unos autores defienden que se trata de una isoforma constitutiva, otros consideran que es una variante de iNOS (Moncada y Erusalimsky, 2002).

El modelo estructural de las NOS (Figura 3) muestra un homodímero con sus subunidades alineadas cabeza-cabeza, con los dominios oxigenasa de ambas subunidades interaccionando para formar el dímero, y los dominios reductasa unidos como extensiones independientes. Las isoenzimas NOS activas poseen un Fe hemo, BH₄, FAD y FMN como grupos prostéticos de unión. Además poseen sitios de unión para la L-arginina, calmodulina y NADPH. Estos sitios de unión han sido identificados en los tres isoformas de la NOS (Bredt y col., 1991; Lamas y col., 1992; Lyons y col., 1992; Xie y col., 1992). Además, la isoforma neuronal posee una secuencia leader N-terminal que no está presente en las otras isoformas. Esta secuencia leader no se requiere para la dimerización, unión de grupos prostéticos o catálisis de la formación de NO, pero está implicada en la unión de proteínas que localizan la nNOS a determinadas zonas de la célula (Brenman y col., 1996).

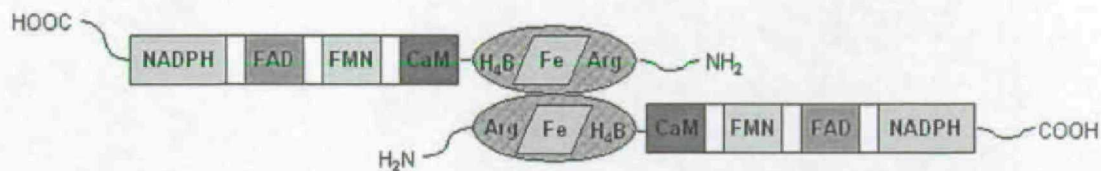


Figura 3: Modelo general de la estructura de las NOS, mostrando un alineamiento cabeza-cabeza. El dominio oxigenasa presenta dominios de unión a L-arginina (Arg), BH₄ y un Fe hemo. El dominio reductasa une FMN, FAD y NADPH. Un sitio de unión a calmodulina (CaM) se localiza cerca del dominio oxigenasa (Tomado de Stuehr, 1997)

La NOS activa se ensambla en dos pasos post-traduccionales secuenciales, cada uno de ellos realizado en uno de los dominios de la enzima. La proteína en primer lugar adquiere un dominio reductasa funcional (Cho y col., 1992) mediante unión de FAD, FMN y calmodulina. Esto genera un monómero de NOS plegado capaz de transferir electrones desde el NADPH, pero inactivo desde el punto de vista de formación de NO. Estos monómeros se ensamblan en dímeros en una reacción promovida por la presencia de BH₄ y L-arginina. La dimerización está acompañada por una incorporación estable de BH₄ en la proteína, con una incorporación máxima de una molécula de BH₄ por subunidad (Marletta, 1993; Griffith y Stuehr, 1995). Esta dimerización implica sólo el dominio oxigenasa de cada subunidad, mientras que el dominio reductasa se ancla como extensiones monoméricas independientes. Este ensamblaje en presencia de BH₄ y L-arginina permite que se produzca la transferencia de electrones entre los dominios reductasa y oxigenasa (Siddhanta y col., 1996), lo cual lleva a adquisición de actividad NOS.

Además de la formación de NO por parte de las diferentes sintasas, recientemente se ha descrito una formación de NO independiente de sus sintasas específicas. Esta formación se da a partir de la enzima nitrito reductasa, y nos muestra que los nitritos son una gran fuente de NO en lugar de un producto inactivo de la oxidación del NO

(Schulz y col., 2005). Esta formación de NO independiente de NOS se ve aumentada en situaciones patológicas, por ejemplo en situación de isquemia miocárdica (Csonka y col., 1999). En condiciones de pH ácido, que se producen durante la isquemia miocárdica, los nitritos se transforman en ácido nitroso, que pueden reaccionar con donantes de electrones para formar trióxido de dinitrógeno. Esta especie reactiva de nitrógeno puede ejercer dos funciones: nitrosilar tioles, o formar NO (Demoncheaux y col., 2002). Asimismo, la xantina óxidoreductasa presente en el endotelio transforma los nitritos en NO, efecto que se ve beneficiado en situaciones de pH ácido, altas concentraciones de NADH o hipoxia (Zhang y col., 1998; Doel y col., 2000; Godber y col., 2000).

Activación de la guanilato ciclasa soluble y formación de cGMP

Multitud de efectos fisiológicos del NO son mediados por el cGMP. La guanilato ciclasa (GC), que produce cGMP a partir de guanosín trifosfato (GTP), es el mecanismo de transducción de señal para el NO, ya que la activa mediante unión a su Fe hemo (Traylor y Sharma, 1992; Stone y Marletta, 1994; Stone y col., 1995). No se conoce el mecanismo por el cual el NO se libera de la guanilato ciclasa, aunque la producción de cGMP finaliza segundos después de la liberación del NO (Garthwaite y col., 1988).

El NO provoca en la GC soluble (sGC) un cambio conformacional que incrementa su actividad (Ignarro y Kadowitz., 1985; Hobbs y col., 1999). La sGC convierte el GTP en cGMP y éste a su vez activa la proteína kinasa G (PKG), que, mediante fosforilación de proteínas, puede ejercer inhibición de canales de Ca^{2+} de tipo L de la membrana plasmática, activación de Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (Vrolix y col., 1988) y el retículo sarcoplásmico (Cohen y col., 1999) e inhibición de la proteína lipasa C (PLC), que en conjunto lleva a una reducción del Ca^{2+} citosólico, desencadenando relajación de la célula muscular lisa, y por lo tanto, dilatación vascular (Rivero-Vilches y col., 2003).

Además, se ha descrito que el NO puede hiperpolarizar la membrana de la célula muscular lisa y, por lo tanto, provocar vasodilatación, mediante una activación directa de canales de K^+ (Bolotina y col., 1994).

- *Prostaciclina (PGI_2)*

La prostaciclina es un prostanoide de la cual se ha descrito un efecto vasodilatador. Los prostanoides se forman en la mayoría de las células del organismo, cumpliendo una función autocrina y paracrina, coordinando gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. En condiciones fisiológicas normales, los prostanoides ejercen un papel homeostático esencial en la citoprotección de la mucosa gástrica, hemostasis, fisiología renal (Smith y col., 1991; Vane y col., 1998; Narumiya y FitzGerald, 2001) y en el control del tono vascular (Davidge, 2001). También se pueden inducir en situaciones patológicas, como procesos inflamatorios y cancerígenos (Seibert y col., 1994).

Los prostanoides se sintetizan *de novo* a partir de ácido araquidónico (AA) liberado de la membrana por la DAG lipasa o la PL A_2 , cuando las células se activan por acción de un estrés mecánico y mediante un estímulo fisiológico o patológico, como la acción de distintas citoquinas, factores de crecimiento u otros estímulos más específicos (colágeno y adenosín difosfato -ADP- en las plaquetas, bradiquinina y trombina en el endotelio, etc). El AA es transformado al precursor de prostanoides prostglandina (PG) G_2 , que se peroxida posteriormente a PGH_2 . Ambas reacciones enzimáticas son catalizadas por la enzima ciclooxygenasa (COX), que consta de dos isoformas distintas con una estructura tridimensional similar y que se encuentran orientadas de tal forma que metabolizan instantáneamente el AA liberado (Morita y col., 1995):

- **COX-1**, localizada en la membrana del retículo endoplásmico, se sintetiza de forma constitutiva (O'Neill y col., 1994) y juega un papel muy importante en funciones fisiológicas distintas, como la agregación plaquetaria y la función renal (Merlie y col., 1988; Funk y col., 1991).
- **COX-2**, que actúa principalmente en la membrana nuclear. Normalmente se expresa a niveles bajos o indetectables, pero se expresa rápidamente de forma inducible en respuesta a estímulos como mitógenos, promotores tumorales y agentes proinflamatorios, como citoquinas y endotoxinas. De ahí que se le atribuya a esta isoforma de COX la mayoría de las funciones inflamatorias de los prostanoideos (Maier y col., 1990; Lee y col., 1992).

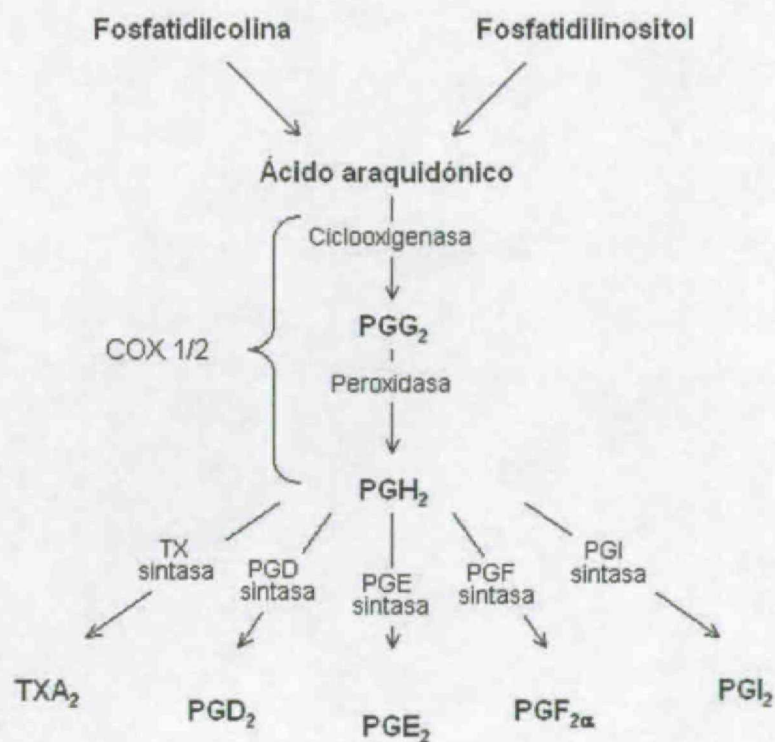


Figura 4: Metabolismo del ácido araquidónico hacia los prostanoideos específicos.

Dependiendo del tipo celular, la PGH_2 es sustrato de distintas enzimas (Figura 4) (Mancini y col., 2000):

- TX sintasa en macrófagos, plaquetas y músculo liso vascular
- PGI_2 sintasa en células endoteliales y del músculo liso vascular
- PGF sintasa en el útero
- PGD sintasa en cerebro y células mamarias

Como los prostanoïdes son químicamente inestables y su metabolismo es muy rápido, han de actuar cerca de su lugar de síntesis, de forma autocrina o paracrina. Para ello, han de interaccionar con sus receptores específicos, de siete dominios transmembrana, pertenecientes a la superfamilia de receptores de tipo rodopsina, acoplados a proteínas G heterotriméricas. Existen nueve receptores específicos de prostanoïdes conocidos, y distintas variantes por splicing con distintos extremos C-terminal (Narumiya y FitzGerald, 2001), cuya nomenclatura depende del ligando que unen (Narumiya y col., 1999): EP1, EP2, EP3 y EP4, específicos de PGE_2 ; DP1 y DP2, específicos de PGD_2 ; FP, específicos de $\text{PGF}_{2\alpha}$; IP, específico de PGI_2 ; y TP, específicos de TXA_2 , aunque a éstos últimos puede unirse también PGH_2 (Patscheke; 1990). Estos receptores se pueden agrupar en tres categorías dependiendo del tipo de proteína G que active y, por tanto, de la respuesta que provoquen:

- EP2, DP, IP y EP4, son vasodilatadores, y activan la proteína G_s , que estimula la producción de cAMP por la adenilato ciclasa (Trist, 1989; Adie, 1992; Ichikawa, 1996).
- TP, FP y EP1, son contráctiles, y activan la proteína G_q , aumentando así la concentración de Ca^{2+} intracelular e influyendo así en el recambio del fosfatidilinositol (Mayeux y col., 1989; Watanabe y col., 1991; Funk y col., 1993; Watabe y col., 1993).
- EP3 A, B y C, inhiben la AC por activación de la proteína G_i .

Este esquema no siempre se cumple, y la proteína G que activa el receptor del prostanoide depende del tipo celular. Por ejemplo, los receptores IP, que normalmente activan las proteínas G_s , pueden activar también las proteínas G_q y G_i en determinadas ocasiones (Schwaner y col., 1995). Asimismo, también puede ocurrir que los prostanoideos no actúen sobre su receptor específico, sino sobre otros receptores de prostanoideos. Se han descrito casos por ejemplo en los que PGI_2 ejerce efecto vasoconstrictor al unirse a los receptores TP (Blanco-Rivero y col., 2005b).

La PGI_2 es muy importante en la regulación de la hemostasis, puesto que controlan el flujo sanguíneo. Se ha visto demostrado que sus niveles se ven aumentados en pacientes con aterosclerosis (Fitzgerald y col., 1987), y en condiciones experimentales de hipertensión (Blanco-Rivero y col., 2005b). Posee un efecto vasodilatador a bajas concentraciones, mientras que a elevadas concentraciones el efecto es vasoconstrictor (Williams y col., 1994; Blanco-Rivero y col., 2005b). Sus acciones principales son inhibición de la agregación plaquetaria y relajación de las células musculares lisas, limitándose su función a modular la acción de otros factores vasoactivos.

La PGI_2 tiene una vida media corta, ya que, como el resto de PGs no se almacena en la célula, sino que se sintetiza y se libera en respuesta a diversos estímulos. A diferencia de las otras PGs, que en su mayoría son degradadas principalmente por enzimas al pasar por la circulación pulmonar, la PGI_2 se inactiva mediante una degradación no enzimática al metabolito estable 6-ceto $PGF_{1\alpha}$, que puede aparecer en la circulación general. Este hecho ha servido de base para suponer que la PGI_2 sería la única PG que tendría algunos efectos vasculares con cierta relevancia sistémica (Waldman y col., 1978).

Los principales factores capaces de estimular la síntesis y la liberación de la PGI_2 son la angiotensina II, la ACh o la BK, y productos liberados de las plaquetas como la

serotonina, la interleuquina-1 (IL-1) y el PDGF, así como los nucleótidos de adenina (Mitchell y col., 1992).

- *Factor hiperpolarizante dependiente del endotelio (EDHF)*

El endotelio libera otro factor vasodilatador llamado EDHF (del inglés, Endothelium Derived Hiperpolarizing Factor), y produce la relajación del músculo liso vascular al inducir hiperpolarización de su membrana celular (Rubanyi y Vanhoutte, 1986b). En los vasos sanguíneos de varias especies de animales esta hiperpolarización es resistente a los inhibidores de la NOS y de la COX, por lo que la relajación endotelio dependiente no sólo sería atribuible al NO o a la PGI_2 (Murphy y Brayden, 1995; Corriu y col., 1996), sugiriendo la existencia de otro factor responsable de dicha relajación. La naturaleza del EDHF no se conoce exactamente, y durante un tiempo se consideró la posibilidad de que el EDHF fuera un metabolito del AA formado por la acción del citocromo P450 (Cohen y Vanhoutte, 1995). Sin embargo, en los vasos sanguíneos de algunas especies los inhibidores del citocromo P450 no afectan a la hiperpolarización dependiente de endotelio.

La hiperpolarización y relajación inducida por el EDHF parece ser debida a un incremento en la conductancia de los canales de K^+ en la membrana del músculo liso vascular, a través de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} e independientes de ATP, ya que no se inhibe en presencia de glibenclamida. Entre los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} implicados en la vasorrelajación del EDHF, los que son capaces de producir una hiperpolarización de la membrana son los de media y baja conductancia (IK_{Ca} y SK_{Ca}). (Gluais y col., 2005).

No se conoce bien el papel fisiológico del EDHF en la regulación del tono vascular, aunque se sabe que se libera *in vitro*, por acción de concentraciones elevadas de ACh o BK (Fujii y col., 1992; Mombouli y col., 1992), sugiriendo la posible mediación parcial de la acción vasodilatadora de estos agentes.

La contribución del EDHF a la relajación dependiente de endotelio varía en función de la arteria que se trate y de la función de la misma. Este factor actúa fundamentalmente sobre la microvasculatura y los vasos de resistencia de pequeño calibre, por lo que parece jugar un papel importante en la regulación local de las resistencias periféricas vasculares (García-Pascual y col., 1996; Levy y col., 1997). Diversos estudios sugieren además que el EDHF participa de manera especialmente importante en la circulación coronaria y en el lecho vascular mesentérico, ya que aproximadamente el 60% o 70% respectivamente de la respuesta vasodilatadora a agentes vasodilatadores dependientes de endotelio está mediada por el EDHF (Maeso y col., 1998; Vázquez-Pérez y col., 2001).

▪ Factores vasoconstrictores

- Endotelina (ET)

La ET fue descubierta a finales de la década de los 80. Es una proteína de 21 aminoácidos, que se sintetiza a partir del gen de la endotelina, que codifica para la preproendotelina, de 203 aminoácidos, que bajo la acción de una endopeptidasa, la transforma en big endotelina, de 39 aminoácidos. Esta última es una pro hormona que se secreta y libera a la circulación; finalmente la enzima convertidora de endotelina (ECE) la transforma en ET-1. Actualmente se conocen tres isoformas diferentes, denominadas ET-1, ET-2 y ET-3, cuya diferencia radica en su secuencia de aminoácidos. Las tres tienen actividad biológica, diferenciándose sólo en su potencia farmacológica, siendo ET-2 la de mayor acción vasoconstrictora, y ET-3 la de menos (Yanagisawa y Masaki, 1989; Anggard y col., 1990).

La ET-1 se sintetiza tanto en condiciones basales como en respuesta a estimulación mecánica, química y humoral. Los factores capaces de regular positivamente la expresión del gen de la endotelina son la angiotensina II, las catecolaminas y los

factores de crecimiento como TGF- β . Por otro lado, hay factores capaces de regular negativamente dicha expresión génica y, por tanto, reducir la liberación de ET-1, como el NO, la PGI₂, la ET-3 o la PGE₂. (Kon y Badr, 1991; Levin, 1995).

La ET-1 actúa a través de receptores específicos, de los cuáles se han descrito dos tipos, los ET_A y los ET_B.

- Los receptores ET_A se localizan principalmente en las células del músculo liso vascular y en los cardiomiocitos. Su estimulación activa la PLC, facilitando la señalización mediada por IP₃ y DAG, que van a aumentar la concentración intracelular de Ca²⁺ y la actividad de la PKC. Como consecuencia, se produce vasoconstricción y proliferación celular (Patocka y col., 2005).
- Los receptores ET_B se encuentran predominantemente en las células endoteliales y en mucha menor medida en las células del músculo liso vascular, y tiene afinidad tanto parra ET-1 y ET-3. Su estimulación produce tanto vasoconstricción como vasodilatación, esta última mediada por un incremento en la producción de NO y PGI₂ (Patocka y col., 2005).

La ET-1 tiene la capacidad de regular mecanismos a corto plazo, como la contracción y la secreción de otros factores vasoactivos como la angiotensina II. A largo plazo, la ET-1 estimula la proliferación de diversos tipos de células, lo que sugiere un posible papel en los procesos de crecimiento cardiovascular y renal como el remodelado vascular, la hipertrofia ventricular y alteraciones glomerulares proliferativas (Levin, 1995).

- Tromboxano A₂ (TXA₂)

El TXA₂ es el resultado de la transformación del derivado del AA, la PGH₂, por acción de la enzima tromboxano sintasa. Fue descubierto a mediados de los 80, En experimentos realizados en anillos de aorta incubados con inhibidores de la COX, donde la vasoconstricción dependiente de endotelio se bloqueaba, sugiriendo así la

presencia de un metabolito del AA (Lüscher y Vanhoutte, 1986). La contracción dependiente de endotelio en anillos aórticos producida por la ACh en presencia de inhibidores de la NOS como el L-NAME también se bloquea con inhibidores de la COX y con antagonistas de los receptores de $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$ (Kung y Lüscher, 1995). Por lo tanto, el TXA_2 y la PHG_2 parecen ser los candidatos que lideran la vasoconstricción dependiente de endotelio (Altieri y col., 1986; Kato y col., 1990).

El TXA_2 , como todos los prostanoides, ejerce sus acciones a través de su receptor específico, denominado TP, del cuál se conocen dos isoformas distintas denominadas α y β , que se distinguen en el extremo carboxi-terminal localizado en el interior de la célula. El hecho de que existan estas isoformas explica las múltiples vías de transducción de señales activadas por este receptor a través de distintas isoformas de proteínas G (Narumiya y col., 1999).

La liberación del TXA_2 y otras PGs vasoconstrictoras puede ser estimulada por distintos agentes vasoconstrictores como la propia ET, la serotonina, la noradrenalina (NA) y la angiotensina II, así como por agentes vasodilatadores como la ACh, sustancias como la nicotina y el ionóforo A23187, y por acciones mecánicas sobre el mismo endotelio (Manabe y col., 1989; Taddei y Vanhoutte, 1993). En consecuencia, el TXA_2 podría mediar las acciones vasculares de estos factores.

Se ha demostrado una participación de esta sustancia vasoconstrictora en determinadas situaciones fisiológicas y patológicas. Por ejemplo, se ha descrito una participación de TXA_2 en la disfunción endotelial debida al envejecimiento (Matz y col., 2000), y en la regulación de la angiogénesis y el desarrollo de la metástasis (Nie y col., 2000).

Como hemos explicado, el TXA_2 se libera principalmente desde el endotelio. Sin embargo, estudios recientes han demostrado una liberación de TXA_2 a partir del músculo liso vascular (Gonzales y col., 2005; Blanco-Rivero y col., 2006).

- Isoprostanos

En la década de los 90, se descubrieron unos compuestos denominados isoprostanos, cuya estructura química era parecida a la de las PGs, y que son el producto de la peroxidación no enzimática del AA catalizada por radicales libres. Lo más relevante es que esta modificación del AA es independiente de la COX (Morrow y col., 1992). La mayor fuente de los isoprostanos reside en la peroxidación de los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de membrana.

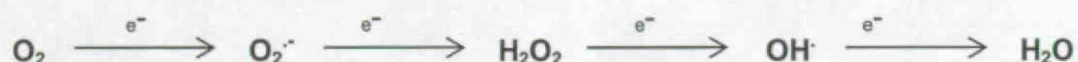
De todos los isoprostanos existentes, el de mayor importancia es el 8-iso-PGF_{2α}, ya que produce importantes respuestas biológicas en distintos tipos celulares, como endotelio, plaquetas, células del músculo liso vascular, epitelio, y células inflamatorias, entre otras. Se ha demostrado una síntesis elevada en patologías cardiovasculares como hipercolesterolemia, aterosclerosis, ictus isquémico agudo o hipertensión pulmonar, y durante la exposición a agentes como angiotensina II, mediadores inflamatorios y factores de crecimiento (Reilly y col, 1998; Janssen, 2001; Cracowski, 2004; Dogne y col., 2005; Morrow, 2005).

▪ Especies reactivas de oxígeno (ROS)

La generación de especies reactivas de oxígeno está asociada con el metabolismo normal de las células (Li y col., 1997). Se generan a partir de reacciones de oxidación-reducción, y actúan como mediadores intracelulares de señales de transducción en procesos fisiológicos y patológicos. En el sistema vascular, las especies reactivas de oxígeno pueden modular el tono y la estructura del vaso sanguíneo, pudiendo incrementar el crecimiento de las células del músculo liso vascular, migración celular, inflamación y depósito de proteínas de la matriz celular, lo que provoca un proceso de remodelado vascular, que incluye disfunción endotelial y engrosamiento de la pared vascular (Griendling y col., 2000).

Generación de las especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno se generan como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción, que transforma el O_2 en H_2O . La reducción del O_2 en presencia de un electrón genera aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) en la siguiente secuencia:



$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} se producen en distinta medida dependiendo del lecho vascular. Participan en la regulación de la estructura y la función vascular, activando distintas vías de señalización, como proteína kinasa activada por mitógenos, proteínas tirosín quinasas y fosfatasas, y diversos factores de transcripción. La activación de dichas cascadas de señalización provoca migración y crecimiento de las células del músculo liso vascular, modulación de la función endotelial, expresión de mediadores pro-inflamatorios, y modificación de la matriz extracelular (Touyz, 2002).

- $O_2^{\cdot-}$ tiene un electrón desapareado muy reactivo, lo cual provoca que sea muy inestable y su semivida sea muy corta. Es hidrosoluble, y por tanto impermeable a las membranas celulares, atravesándolas a través de canales aniónicos. Puede producirse a partir de múltiples fuentes en la pared vascular (Abe y Berk, 1998; Wang y col., 1999; Sorescu y col., 2002), incluyendo las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, pequeñas moléculas que son constituyentes celulares normales (flavinas, tioles, catecolaminas...), productos del metabolismo del ácido araquidónico, xantina oxidasa... Su fuente principal son las NAD(P)H oxidasas, presentes en endotelio, adventicia y células

musculares (Mohazzab y Wolin, 1994), catalizando la producción de $O_2^{\cdot-}$ reduciendo el O_2 y usando el NAD(P)H como donante de electrones.

Parece ser que el mecanismo que controla la actividad de estas enzimas depende de la disponibilidad de NAD(P)H citosólico (Mohazzab y col., 1994; Gupte y col., 1999; Wolin y col., 1999). El índice de producción de $O_2^{\cdot-}$ por las NAD(P)H oxidasas vasculares parece ser dependiente de la concentración de O_2 , lo que permite a la oxidasa funcionar como un sensor fisiológico de la presión de O_2 (Mohazzab y col., 1994; Wolin y col., 1999).



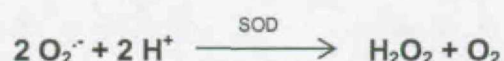
La actividad de este complejo está mediada por el sistema Ras (Irani y Goldschmidt-Clermont, 1998; Geiszt y col., 2001). Las proteínas Ras pertenecen a una superfamilia con afinidad por el GTP, que se une a Ras, con actividad GTPasa gracias a su unión con la proteína GAP. La energía liberada al hidrolizar un fosfato se emplea en producir un cambio conformacional en el complejo NAD(P)H oxidasa, lo cual provoca la formación de $O_2^{\cdot-}$.

Se ha visto además que las tres isoformas de NOS son capaces de producir $O_2^{\cdot-}$ mediante un proceso denominado desacoplamiento (Pou y col., 1992; Wever y col., 1997, Xia y Zweier, 1997), que consiste en la transferencia de electrones a O_2 en lugar de a L-arginina. Este anión reacciona rápidamente con el NO reduciendo así su vida media y comenzando así la ruta de producción de $ONOO^{\cdot-}$. Este proceso sólo ocurre en situaciones de bajos niveles de L-arginina o BH_4 y en presencia de LDL nativa/oxidada (Vergnani y col., 2000) o altas concentraciones de glucosa (Zou y col., 2002).

Los $O_2^{\cdot-}$ pueden actuar como agente oxidante, siendo reducido a H_2O_2 , o como agente reductor, cediendo su electrón desapareado al NO para producir $ONOO^{\cdot-}$ (Fridovich, 1997). En condiciones fisiológicas, en solución acuosa a pH

neutro, la reacción más habitual que sufren es la dismutación, produciendo H_2O_2 . Sin embargo, si tenemos NO en exceso, gran cantidad de $\text{O}_2^{\cdot-}$ reacciona con el NO para producir $\text{ONOO}^{\cdot-}$ (Darley-Usmar y col., 1995).

- H_2O_2 es liposoluble, y es estable en condiciones fisiológicas. Se produce principalmente por dismutación de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Esta reacción puede ser espontánea o ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) y se da principalmente a bajas concentraciones de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y altas concentraciones de SOD, que son las condiciones fisiológicas normales.



H_2O_2 es eliminado del organismo por acción de la glutathion (GSH) peroxidasa, que utiliza el GSH reducido para transformar el H_2O_2 en H_2O , y la catalasa, que lo transforma en H_2O sin necesidad de ningún cofactor.

- OH^{\cdot} es un potente oxidante que puede producirse directamente a partir de H_2O o de H_2O_2 , en este caso en presencia de moléculas que contengan hierro, como Fe^{2+} . Es muy reactivo, y por tanto su semivida es muy corta. A diferencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , induce daño local en el lugar donde se forma.

Mecanismos antioxidantes

Los seres vivos han desarrollado mecanismos antioxidantes para mantener su supervivencia frente al estrés oxidativo. Dichos mecanismos son diferentes en los compartimentos intra y extracelulares, e incluyen mecanismos tanto enzimáticos (SOD, catalasa, GSH peroxidasa) como no enzimáticos (Vitaminas C y E, carotenoides, etc.) (Finkel, 1998).

- Se han identificado tres isoformas distintas de SOD en mamíferos (Fukai y col., 2000): Cu/Zn SOD, citosólica, con cobre y zinc en su grupo prostético; ecSOD,

también con cobre y zinc, pero extracelular; y MnSOD, con manganeso en su grupo prostético, localizada exclusivamente en la mitocondria.

Las arterias contienen grandes cantidades de Cu/Zn SOD, lo cual sugiere un papel muy importante de esta isoforma de la SOD en la pared vascular (Stralin y col., 1995; McIntyre y col., 1999).

- H_2O_2 es hidrolizado por la catalasa y la GSH peroxidasa para obtener H_2O y O_2 . La GSH peroxidasa es la mayor protectora de la membrana plasmática contra la peroxidación lipídica, ya que dona H^+ a los lípidos de membrana para mantenerlos en su estado reducido.
- Además de antioxidantes enzimáticos endógenos, podemos encontrar numerosos antioxidantes no enzimáticos en los sistemas biológicos, entre ellos el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), flavonoides, carotenoides, bilirrubina y tioles (Finkel, 1998). El ácido ascórbico es hidrosoluble, mientras que el α -tocoferol y el β -caroteno son liposolubles. Las proteínas unidas a metales, como hemoglobina, mioglobina, transferrina, ferritina y ceruloplasmina están implicadas en la reducción de la formación de OH^\cdot .

Por lo tanto, los niveles de ROS dependen tanto de su producción como de su eliminación. Un desbalance entre ambos procesos tiene como consecuencia un aumento del metabolismo del NO:

Reacción del NO con $O_2^{\cdot -}$

La sobreproducción de NO puede producir daños celulares debido a la formación de especies de nitrógeno reactivas citotóxicas, como la producida por unión con los aniones superóxido (Beckman y Koppenol, 1996). De hecho, la toxicidad del NO *in*

vivo es debida a la reacción del NO con $O_2^{\cdot-}$, para así formar $ONOO^{\cdot-}$ mediante una reacción químicamente espontánea e irreversible. El $ONOO^{\cdot-}$ no es un radical libre, puesto que los electrones desapareados tanto del NO como del $O_2^{\cdot-}$ se han combinado para formar un nuevo enlace químico.



El $ONOO^{\cdot-}$ es rápidamente protonado a ácido peroxinitroso ($ONOOH$), que genera gran cantidad de especies citotóxicas con actividad nitrosilante, hidroxilante y oxidativa; por ejemplo, los residuos de cisteína y metionina pueden ser oxidados, mientras que tirosina y triptófano pueden sufrir nitrosilación (Beckman y Koppenol, 1996). De hecho, la medición de residuos de 3-nitrotirosina se utiliza habitualmente como biomarcador de la formación de $ONOOH$ (Halliwell y col., 1999).

A pesar de que el $ONOO^{\cdot-}$ puede causar daños tisulares, existen mecanismos de detoxificación diseñados para contrarrestar su potencial para dañar los tejidos. Por ejemplo, se ha demostrado que el $ONOO^{\cdot-}$ puede reaccionar con compuestos que poseen un grupo alcohol funcional, como la glucosa, para formar así un donante de NO con características vasodilatadoras (Moro y col., 1995). Este mecanismo de protección tiene particular relevancia en el proceso de isquemia-reperfusión cardíaco (Nossuli y col., 1997). Además, la formación de $ONOO^{\cdot-}$ puede generar tioles nitrosilados que pueden actuar como donantes endógenos de NO, induciendo así vasodilatación (Wu y col., 1994; Li y col., 2004b) e inhibición de la agregación plaquetaria (Moro y col., 1994).

▪ Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son moléculas peptídicas que actúan de manera local, aisladamente, o en combinación con otros agentes vasoactivos, como la angiotensina

II o la ET-1, para promover síntesis de proteínas y crecimiento celular (Chabrier, 1996) a través de receptores específicos de membrana, y la consiguiente activación de proto-oncogenes (Scott-Burden y Vanhoutte., 1993).

Entre los diversos factores de crecimiento cabe mencionar el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGFb), el factor-1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el factor de crecimiento conectivo tisular (CTGF). Todos estos factores pueden inducir proliferación y crecimiento de las células del músculo liso vascular, alterando a largo plazo la función vascular (Rizzoni, 2002; Schiffrin, 2002).

1. b Túnica media

La túnica media está formada por una capa de fibras musculares lisas vasculares orientadas circularmente, con fibras reticulares asociadas a ellas, y un pequeño número de fibras elásticas individuales. Las fibras musculares lisas de la túnica media son las responsables del mantenimiento de la presión vascular, por la regulación del diámetro de la luz del vaso. Las células musculares que conforman la túnica media son largas y fusiformes, de núcleo alargado, unidas entre sí mediante uniones en hendidura. Contienen haces de actina y miosina, responsables de la contracción por el desplazamiento de las fibras de actina sobre las de miosina. En la contracción del músculo liso se pueden distinguir dos componentes, una contracción fásica y una contracción tónica (Rasmussen y col., 1987). La primera se caracteriza por una respuesta rápida y transitoria, modulada por el sistema Ca^{2+} -calmodulina (Dillon y col., 1981), mientras que la segunda se regula por la caldesmosina (Smith y col., 1987), proteína contráctil que está asociada al dominio actina-miosina.

▪ Mecanismo de contracción del músculo liso vascular

Los estímulos que provocan la contracción del músculo liso vascular pueden ser de distinta naturaleza. Todos ellos tienen en común que producen un incremento intracelular de Ca^{2+} , que se une a la calmodulina; el complejo Ca^{2+} -calmodulina cataliza la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina al combinarse con la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), lo que permite la formación de puentes cruzados en la miosina y la interacción de éstos con los filamentos de actina, provocando así la contracción. La energía necesaria para la contracción proviene del adenosín trifosfato (ATP). El incremento intracelular del Ca^{2+} puede ser debido a la estimulación de la entrada de Ca^{2+} extracelular principalmente por la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje localizados en la membrana plasmática, o a la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, por la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC), que estimula la hidrólisis del fosfatidil inositol -4, 5- bifosfato (PIP_2) y aumenta la formación de inositol -1, 4, 5- trifosfato (IP_3), estimulando la liberación de Ca^{2+} (Bülbring y Tomita, 1987; Timmermans y col., 1987; Minnerman, 1988).

Asimismo, cuando disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+} , la calmodulina se disocia de la MLCK, inactivándola, y los grupos fosfato son eliminados posteriormente por la fosfatasa de la miosina.

1. c Túnica adventicia

La túnica adventicia está formada principalmente por tejido conjuntivo con fibras elásticas y de colágeno tipo I, además de por una red laxa de fibras elásticas delgadas y terminaciones nerviosas que liberan distintos neurotransmisores (Li y Duckles, 1992; Boeckxstaens y col., 1997; Marín y Balfagón, 1998). Los neurotransmisores liberados, a través de sus receptores específicos, van a ejercer su acción sobre los distintos tipos celulares que componen la pared vascular y, por lo tanto, actúan como modulador del

tono vascular. Además, la túnica adventicia es una fuente de radicales de oxígeno, como O_2^- , que afectan tanto a la función del músculo liso vascular como a la de las células endoteliales, regulando de esta manera el tono vascular (Pagano y col., 1995).

Las terminaciones nerviosas que llegan a la túnica adventicia tienen gran importancia en el control de las respuestas vasomotoras. Entre la terminación nerviosa y las células vasculares se establece comunicación química a través de la hendidura sináptica. Este tipo de comunicación se caracteriza por la liberación de neurotransmisores desde la terminación nerviosa, y por la interacción de dichos neurotransmisores con receptores específicos de la célula postsináptica. La naturaleza química y/o función de los neurotransmisores liberados depende de la especie y del lecho vascular, y ejercen su acción sobre las distintas células que constituyen la pared del vaso, incluidas otras terminaciones nerviosas.

En la circulación mesentérica, los neurotransmisores liberados a partir de las terminaciones nerviosas, interaccionarán y modularán tanto las respuestas presinápticas como postsinápticas (Takenaga y Kawasaki, 1999).

En la regulación nerviosa de la arteria mesentérica de rata se ha demostrado la existencia, entre otras, de tres tipos de inervación: adrenérgica, sensitiva y nitrérgica.

▪ Inervación adrenérgica

La inervación adrenérgica libera principalmente noradrenalina (NA) junto a neuropéptido Y (NPY) y ATP (Donoso y col., 1997a).

La NA es una amina biógena que pertenece al grupo de las catecolaminas. Una vez sintetizada, es transportada en vesículas por el axón hasta llegar a la terminación nerviosa. Su secreción a la hendidura sináptica se realiza normalmente por exocitosis, aunque puede ser liberada de forma espontánea. Puede actuar sobre dos tipos de receptores adrenérgicos específicos, localizados tanto pre como postsinápticamente:

- Receptores α -adrenérgicos: Se localizan tanto en la pared vascular como en la terminación nerviosa, y pueden ser de tipo α_1 - y α_2 - postsinápticos y α_2 - presinápticos, aunque estos últimos se han encontrado también en músculo liso vascular y endotelio de aorta (Ruffolo y col., 1981; Egleme y col., 1984; Descombes y Stoclet, 1985) y mesentérica (Itoh y col., 1987, Ferrer y Osol, 1998). Los receptores α -postsinápticos están implicados en la regulación de la resistencia vascular periférica.

La NA liberada desde las terminaciones nerviosas activa los receptores α_1 -postsinápticos, los cuales están acoplados a proteínas G, y estimulan a la enzima PLC. Esta enzima cataliza la hidrólisis de PIP_2 , dando lugar a IP_3 y diacilglicerol (DAG). Ambos compuestos actúan como segundos mensajeros, potenciando la liberación de Ca^{2+} intracelular y activan la enzima proteína kinasa C (PKC) (Hein y Kobilka, 1995; Zhong y Minneman, 1999; García-Sainz y col., 2000).

Los receptores α_2 -presinápticos inhiben la liberación de NA mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. Cuando estos receptores se activan, inhiben a la enzima adenilato ciclasa (AC) (Cotecchia y col., 1990; Wise y col., 1997), inhiben la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Cotecchia y col., 1990) y activan los canales dependientes de K^+ (Surprenant y col., 1992). Los receptores α_2 -presinápticos también pueden acoplarse a otras vías de señalización intracelular mediante la activación del intercambiador Na^+/H^+ (Limbird, 1988) y de las enzimas PL A_2 , C y D (Cotecchia y col., 1990; MacNulty y col., 1992; Kukkonen y col., 1998).

- Receptores β -adrenérgicos: En general, los receptores β -adrenérgicos se localizan en las células del músculo liso vascular (Ferrer y col., 1996; Briones y col., 2005), aunque también están presentes en células endoteliales (Akimoto y col., 2002). Están clasificados como receptores β_1 -postsinápticos y β_2 -presinápticos (Guimaraes y Moura, 2001).

Los receptores β_2 -presinápticos juegan un importante papel en la regulación del tono vascular, ya que facilitan la liberación de NA desde las terminaciones **adrenérgicas** (Ferrer y Balfagón, 2001; Ferrer y col., 2003).

Cuando los receptores β_1 -postsinápticos, que están acoplados a proteínas G, son activados, estimulan la actividad de la enzima AC e inducen el aumento de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). Este aumento conlleva a la activación de la enzima proteína kinasa A (PKA) que, por distintos mecanismos, reduce la liberación de Ca^{2+} intracelular y, como consecuencia, favorece la relajación del músculo liso vascular (Werstiuk y Lee, 2000).

Asimismo, la NA puede activar receptores β -adrenérgicos presentes en la células endoteliales, haciendo así que se active la eNOS y se libere NO (Arribas y col., 1994; Conde y col., 2000).

La NA posee mayor afinidad por los receptores α - que por los receptores β -, y debido al predominio de los receptores α -adrenérgicos en las células musculares del músculo liso vascular, el efecto neto de la estimulación simpática es vasoconstrictor (Vanhoutte y col., 1981).

Existen varios mecanismos de inactivación o degradación de la NA. La recaptación de parte de la NA que queda en la hendidura sináptica permite a la neurona crear nuevas vesículas presinápticas, o degradar el neurotransmisor mediante la enzima monoaminoxidasa (MAO). Además, la NA se inactiva por metilación mediante la enzima catecolamina O-metil transferasa, presente en todos los tejidos, y es eliminada al torrente sanguíneo. Parte de la NA liberada difunde a los tejidos circundantes y después a la sangre (Guyton y Hall, 2006).

El NPY ha sido menos estudiado pero se ha demostrado su implicación en el control simpático del tono vascular (Lundberg y Tatemoto, 1982; Tatemoto y col., 1982). Puede actuar sobre su receptor postsináptico, Y_1 potenciando la acción

vasoconstrictora de la NA en numerosos vasos (Donoso y col., 1997b) y sobre su receptor presináptico, Y_2 reduciendo la liberación de NA (Donoso y col., 1988).

El ATP también participa en la respuesta vasomotora, actuando sobre receptores purinérgicos situados en la superficie celular (Ralevic y Burnstock, 1998). Se encuentran distribuidos en neuronas del sistema nervioso central y periférico. En vasos se encuentran en las terminaciones nerviosas, donde median la respuesta neurotransmisora del ATP y en células musculares, donde regulan y/o modulan la contracción (Evans y col., 1995).

▪ Inervación sensitiva

La inervación sensitiva libera principalmente el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y sustancia P. El CGRP es uno de los vasodilatadores más potentes, implicado en la regulación de la resistencia vascular y del flujo sanguíneo regional (Maggi y Meli, 1988; Bell y McDermott, 1996). El CGRP está distribuido en el sistema nervioso y en el sistema cardiovascular (Wimalawansa, 1996). En el sistema nervioso periférico, el CGRP se sintetiza en los ganglios de las raíces dorsales cuyos axones rodean los vasos sanguíneos y transportan el CGRP hasta las terminaciones (Bell y McDermott, 1996). Hay dos isoformas de CGRP, el α -CGRP producido por splicing alternativo del gen CGRP/Calcitonina en el sistema nervioso y β -CGRP en tejidos neuronales (Wimalawansa, 1996). Ambas isoformas se diferencian en alguno de los aminoácidos de su secuencia peptídica pero sus actividades biológicas son similares en la mayoría de los lechos vasculares (Bell y McDermott, 1996). La acción vasodilatadora del CGRP se produce por reducción del Ca^{2+} intracelular, reducción de la sensibilidad contráctil en respuesta a Ca^{2+} , incremento los niveles intracelulares de cAMP, activación de los canales de K^+ dependientes de ATP. Además de esta respuesta directa, se ha descrito que la respuesta vasodilatadora a CGRP puede estar

mediada por la liberación de NO endotelial (Boussery y col., 2005; Thakor y Giussani, 2005).

▪ Inervación nitrérgica

En cuanto a la inervación nitrérgica, estudios histológicos revelaron que el músculo liso vascular estaba innervado por neuronas que contenían óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Bredt y col., 1990). Se ha descrito la existencia de NO en terminaciones nerviosas que rodean distintos lechos vasculares incluyendo la arteria mesentérica (Yoshida y col., 1994) y cuya liberación participa en la modulación del tono vascular (Marín y Balfagón, 1998). Su mecanismo de acción se ha explicado en el apartado correspondiente (Página 3).

2. Proteína kinasa C (PKC)

La PKC es una serin-treonin quinasa ampliamente distribuída e identificada inicialmente en músculo liso por Howe y Abdel-Latif (1988). Su implicación en la contracción del músculo liso vascular ha sido ampliamente estudiada, ejerciendo un papel relevante en la fosforilación de la MLC, y manteniendo así la contracción muscular (Salamanca y Khalil, 2005).

La estructura de PKC consiste en un polipéptido dividido en dos dominios, uno catalítico y uno regulador (Figura 5). Este dominio regulador contiene los sitios de unión a Ca^{2+} , fosfolípidos y DAG y, en la mayoría de las isozimas, una secuencia de auto-regulación denominada pseudosustrato, que se desdobla cuando se unen DAG y fosfolípidos, dejando así libre el dominio catalítico (Walsh y col., 1996; Morgan y Leinweber, 1998). Tras su activación, la PKC se trasloca desde su "pool" inactivo (citosol) a su "pool" activo (componente celular particulado). La mayoría de las

isozimas de PKC poseen múltiples sitios de traslocación en el músculo liso (Khalil y Morgan, 1993; Liou y Morgan, 1994; Damron y col., 1998; Kanashiro y Khalil, 1998a; Hai y col., 2002; Di Liberto y col., 2003).

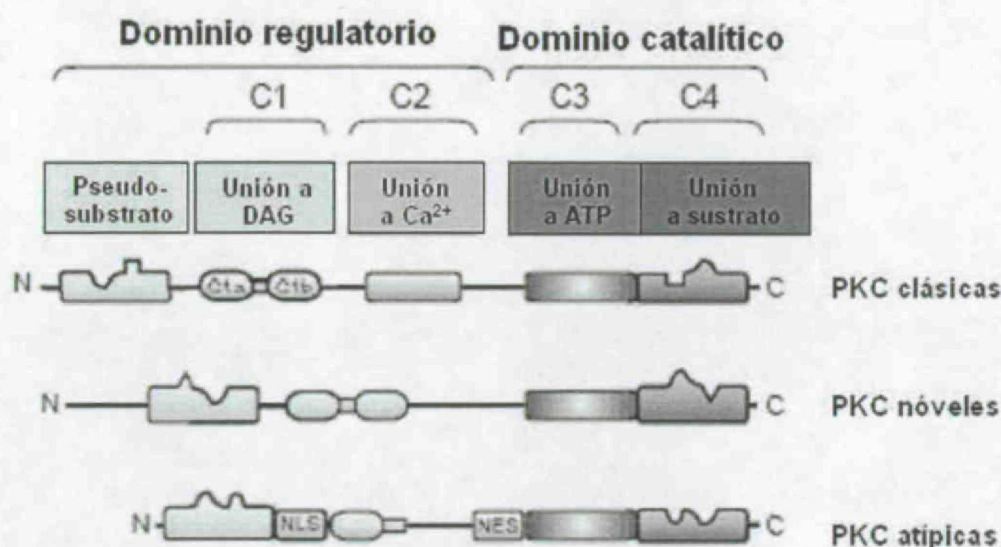


Figura 5: Clasificación y características estructurales de las isoformas de PKC (Modificado de Spitaler y Cantrell, 2004)

Comprende una familia de 12 isozimas producto de 11 genes distintos, clasificados en tres grupos: convencionales, nóveles y atípicas.

- **Convencionales**, incluyendo las isoformas α , β_1 , β_{II} y γ . Las PKC clásicas tienen un dominio C₁ que une DAG, y un dominio C₂ que une Ca^{2+} . Además tienen un motivo pseudosubstrato en su extremo N terminal, similar en su estructura al motivo del sustrato susceptible de ser fosforilado, pero con alanina en lugar de serina o treonina, bloqueando así de forma estérica el dominio catalítico de la PKC (Newton, 2003). La unión del DAG aumenta la afinidad del enzima por la fosfatidilserina, desencadenando así una alta afinidad por el Ca^{2+} en concentraciones fisiológicas, llevando al enzima a un cambio conformacional que

libera el motivo pseudosustrato y aumenta la capacidad catalítica del enzima (Newton, 1995).

- **Nóveles**, que son las isoformas δ , ϵ , η , θ y μ . Son reguladas también por DAG, pero de forma independiente de Ca^{2+} . El dominio C_2 también une fosfolípidos de forma Ca^{2+} dependiente, lo cual lleva a la activación de PKC. Sin embargo las isoformas de PKC independientes de Ca^{2+} pueden unir fosfolípidos en una estructura similar a C_2 , dominio responsable también de la interacción con los receptores de PKC activada, que regulan la activación y translocación de PKC (Mellor y Parker, 1998).
- **Atípicas**, que son las isozimas ζ , ι y λ . Su actividad catalítica es independiente de DAG y Ca^{2+} . Parecen estar reguladas por localización, por interacción con proteínas reguladoras y señales de localización (NLS) y exportación nuclear (NES) en su dominio regulatorio (Mellor y Parker, 1998; Newton, 2003).

Estas isozimas poseen distintos activadores, las isoformas convencionales y nóveles se activan mediante ésteres de forbol (PDBu, PMA o mezereína) y análogos estables del DAG, mientras que las atípicas no se ven afectadas por estos activadores (Newton y col., 2003). Asimismo, existen inhibidores no selectivos de PKC que actúan sobre otras proteína kinasas, como H-7, estaurosporina y calfostina C (Davies y col., 2000), y derivados de la estaurosporina como Gö6976, Gö6850, Gö 6983 y Ro-318220, que poseen una alta selectividad por la PKC, pero no sobre determinadas isozimas, o en el caso de Gö6976 y BIM-1, que son parcialmente selectivas por las isoformas convencionales (Martiny-Baron y col., 1993; Gschwendt y col., 1996).

3. Hormonas sexuales masculinas

3. a Síntesis y mecanismo de acción de las hormonas sexuales masculinas

Los andrógenos son las hormonas sexuales que confieren el desarrollo sexual en los machos, y mantienen las características sexuales masculinas. Se encargan de desarrollar los caracteres sexuales primarios en el embrión y los caracteres sexuales masculinos secundarios en el momento de la pubertad. Además, contribuyen al crecimiento general y la síntesis proteica, en particular, en la síntesis de miofibrillas musculares, como se evidencia en la mayor musculatura de los machos en múltiples especies (Randall y col., 2001).

Su producción y secreción se realiza principalmente en los testículos, específicamente en las células de Leydig, aunque también existe producción de andrógenos a nivel de la corteza suprarrenal. Su liberación está promovida por la hormona folículo estimulante (FSH) y por la hormona luteinizante (LH), que son sintetizadas en la adenohipófisis y liberadas a su vez en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas hipotálamica (GnRH). Las hormonas sexuales esteroideas ejercen retroalimentación negativa sobre las neuronas secretoras del GnRH del hipotálamo y sobre las células endocrinas de la adenohipófisis que producen FSH y LH (Randall y col., 2001).

Al igual que el resto de hormonas de naturaleza esteroide (mineralocorticoides, glucocorticoides y estrógenos), los andrógenos se sintetizan a partir del colesterol. La activación de la síntesis de las hormonas esteroides implica que se produzca hidrólisis de los ésteres de colesterol y tránsito del colesterol a la mitocondria, donde se transforma en pregnenolona, precursor de todas las hormonas esteroides. A partir de la pregnenolona se obtiene progesterona y posteriormente testosterona (Mathews y

col., 2000), que constituye el andrógeno circulante más abundante en machos (Figura 6).

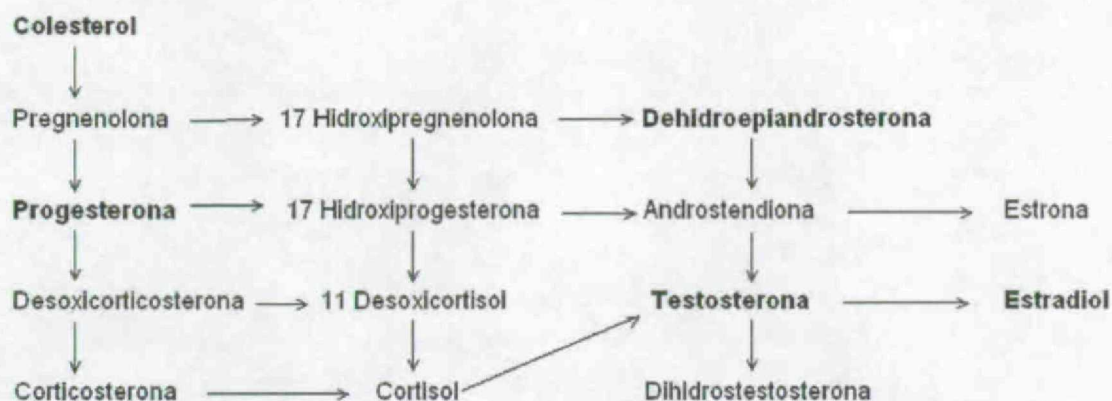


Figura 6: Ruta de síntesis de las hormonas sexuales masculinas (adaptado de <http://www.fisterra.com>)

La corteza suprarrenal, el testículo, el ovario y la placenta utilizan la misma ruta de síntesis de hormonas esteroideas. Sin embargo, cada órgano tiene una dotación enzimática distinta, lo cuál determina que la cantidad relativa de los productos finales de esta ruta sea distinta. Como hemos dicho, los testículos sintetizan principalmente andrógenos, de los cuáles los más importantes son testosterona, dihidrotestosterona (DHT) y androstendiona. La cantidad de testosterona sintetizada es tan grande en relación con los otros dos andrógenos que puede considerarse como el principal andrógeno testicular (Tresguerres y col., 1999).

La testosterona puede actuar directamente sobre las células blanco o ser reducida a dihidrotestosterona (DHT) por acción de la 5α reductasa, mucho más potente, puesto que tiene mayor afinidad con el receptor de andrógenos intracelular. La testosterona puede además transformarse en 17β estradiol en los tejidos periféricos por acción de la enzima aromatasa. Esta transformación podría ser un factor de confusión a la hora

de analizar los efectos de los andrógenos sobre el organismo, puesto que el estradiol es precursor de otros estrógenos, presentes en machos en cantidades apreciables de manera fisiológica. Además, el 17β estradiol ejerce una vasodilatación marcada en varios lechos vasculares (Chester y col., 1995; Browne y col., 1999; Salom y col., 2001; English y col., 2001). Por lo tanto esta aromatización puede presentar un mecanismo de acción potencial por el cuál la testosterona ejerza vasodilatación. Para comprobarlo, se realizaron estudios con inhibidores de la aromatasa (Yue y col., 1995; Tep-aarenan y col., 2002) y con antagonistas de los receptores de estrógenos (Chou y col., 1996), en los que no se observó una disminución de la vasodilatación, que fue similar a la observada con el análogo no hidrolizable dihidrotestosterona (Deenadayalu y col., 2001). Por lo tanto, la aromatización de la testosterona a 17β estradiol no parece estar implicada en la respuesta vasodilatadora de la testosterona.

La testosterona es transportada a través del torrente sanguíneo unida a proteínas de unión, que pueden ser o globulinas de unión a hormonas sexuales, a las cuáles se une fuertemente, o a albúmina, a la cual se une con una afinidad menor. El propósito de esta unión es mantener la hormona de forma inactiva hasta su presentación en al célula diana, donde se une al receptor de andrógenos y ejerce su función (Heinlein y Chang, 2002). El proceso por el cual ocurre la transferencia de la testosterona al citoplasma es desconocido, al igual que cómo provoca la célula la disociación del complejo hormona-globulina (Heinlein y Chang, 2002).

Los andrógenos son ligandos de los receptores de andrógenos, formando complejos que se unen a promotores génicos y regulan la transcripción de diversos genes. Los receptores de andrógenos, al igual que otros receptores de esteroides, están compuestos de varios dominios funcionales (Evans, 1988): una región N-terminal hipervariable, que regula la actividad transcripcional, un dominio central de unión a

DNA altamente conservado, una región bisagra, y un largo dominio C-terminal, de unión a ligando (Figura 7).

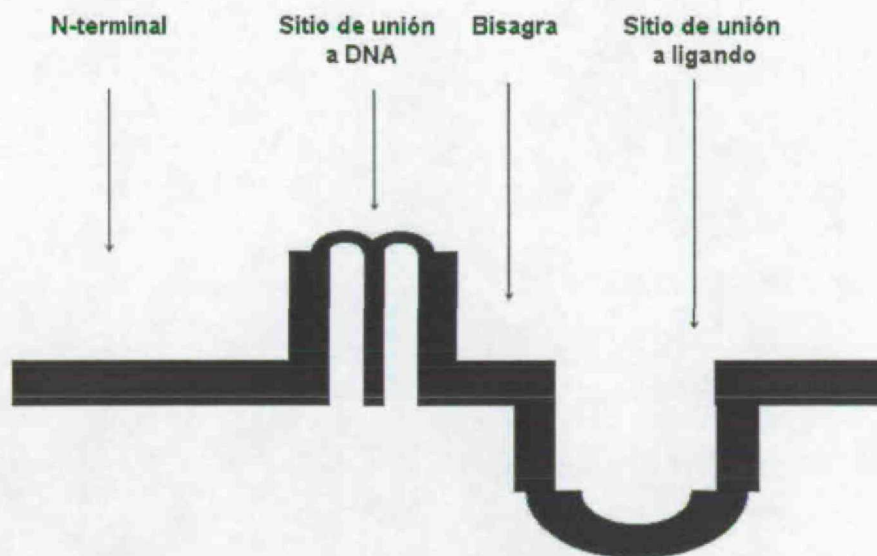


Figura 7: Esquema representativo de los dominios funcionales del receptor de andrógenos (Adaptado de Chen y col., 2005).

Los receptores de andrógenos modulan la transcripción génica mediante reconocimiento y unión al elemento de respuesta de andrógenos (Freedman, 1992). El receptor funciona sólo tras su unión con los andrógenos. Esta unión induce una dimerización del receptor, su localización en el núcleo y su unión al DNA, en los elementos de respuesta a andrógenos, en forma de homodímero. Cada uno de los monómeros contacta la región palindrómica del elemento de respuesta (Wong y col., 1993).

La interacción de las hormonas sexuales con los receptores de testosterona citosólicos o nucleares estimulan gran número de efectos, tanto genómicos como no genómicos, sobre el sistema cardiovascular:

- Los efectos genómicos llevan al crecimiento de las células endoteliales, mediante la acción de la MAP quinasa (MAPK) (Geraldés y col., 2002). Hay

estudios que sugieren que los andrógenos aceleran el crecimiento vascular estimulando la proliferación de las células del músculo liso vascular, aunque también los hay que postulan lo contrario (Somjen y col., 1998; Wynne y Khalil, 2003). Por tanto, parece ser que los andrógenos ejercen un efecto proliferativo o antiproliferativo de sus células diana dependiendo de su concentración.

- Existen receptores de andrógenos específicos en la membrana plasmática que inducen efectos no genómicos (Gerhard y Ganz, 1995; Farhat y col., 1996). Estos efectos no son eliminados por inhibidores de la transcripción génica, y pueden producirse sin necesidad de que la hormona se una a los receptores intracelulares, o que los receptores se unan al DNA (Cato y col., 2002; Simoncini y Genazzani, 2003). Estos efectos se caracterizan por un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} debido a un incremento en la cantidad de IP_3 (Estrada y col., 2000). A su vez, puede producirse un incremento la fosforilación de ERK 1/2 (Estrada y col., 2003). Estos efectos no se ven bloqueados por antagonistas de los receptores de andrógenos, como el acetato de ciproterona, indicando que existen distintos mecanismos de acción no genómicos de los andrógenos (Estrada y col., 2003).

3. b Efectos de la testosterona sobre la función vascular

Estudios epidemiológicos muestran que la incidencia de patologías cardiovasculares es menor en mujeres premenopáusicas que en hombres de la misma edad (Isles, 1995; Bae y Zhang, 2005; Tatchum-Talom y col., 2005). La mayoría de las líneas de investigación acerca del papel del género en la función vascular se han centrado principalmente en los estrógenos (Joswig y col., 1999), habiéndose descrito el papel protector de los estrógenos a nivel del sistema cardiovascular (Clarkson, 1998).

Por el contrario, tradicionalmente los andrógenos se han asociado a un efecto deletéreo sobre el sistema cardiovascular, debido a la prevalencia de enfermedades cardiovasculares en varones (Wingard y col., 1983; Jousilahti y col., 1999).

Sin embargo, estudios experimentales recientes han demostrado un efecto preventivo de los andrógenos frente a enfermedades cardiovasculares similar al producido por los estrógenos (Perusquia, 2003). Numerosos estudios con animales de experimentación han demostrado que la testosterona ejerce un efecto vasodilatador directo en arterias de varias especies, incluyendo conejo, perro, cerdo y rata, y tanto en estudios *in vivo* (Chou y col., 1996) como *in vitro* (Yue y col., 1995; Murphy y Khalil, 1999; Crews y Khalil, 1999; English y col., 2000a). Además, se ha demostrado un efecto vasodilatador de la testosterona sobre la aorta torácica (Yue y col., 1995; Perusquia y col., 1996) y en vasos de los lechos mesentérico (Tep-aarenan y col., 2002) y pulmonar (English y col., 2001; Jones y col., 2002). Se ha descrito también una inhibición en el desarrollo de la aterosclerosis en aorta de conejo macho debida a los andrógenos (Alexandersen y col., 1999), y una disminución de la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido y TNF- α en células endoteliales de cordón umbilical humano (Norata y col., 2005). Además, recientemente se han llevado a cabo ensayos clínicos con testosterona en isquemia miocárdica y se ha visto un efecto beneficioso de la misma (Jones y col., 2004a). También se ha descrito un efecto protector de la administración de testosterona a corto plazo mejorando la resistencia cardíaca a isquemia por esfuerzo, sugiriendo la existencia de mecanismos vasodilatadores inducidos por esta hormona (Rosano y col., 1999). Los efectos beneficiosos sobre la isquemia miocárdica se atribuyen a esta actividad vasodilatadora. Asimismo, se han diagnosticado numerosos casos de hipotestosteronemia en pacientes con enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, hiperinsulinemia, diabetes, obesidad o envejecimiento (Alexandersen y col., 1996; English y col., 1997; English y col., 2000b; Deenadayalu y col., 2001). Por lo tanto, estas observaciones están en contra del efecto deletéreo de los andrógenos

sobre el sistema cardiovascular, y sugieren que la testosterona ejerce un efecto beneficioso sobre el sistema cardiovascular.

El tono vascular está influido, como hemos explicado anteriormente, por el endotelio y las células musculares. En ambos tipos de células se expresan receptores de testosterona (Kim-Schulze y col., 1996; Thompson y col., 2000), en diversos lechos vasculares, dependiendo del género. Su localización subcelular se puede ver modulada por agonistas y antagonistas específicos de estos receptores (Tabla 1). Además, se ha descrito un aumento de la expresión del mRNA del receptor de andrógenos en un tratamiento combinado con testosterona y estradiol, lo cual sugiere una acción colaboradora de ambos en la expresión del receptor de andrógenos (Wynne y Khalil, 2003).

Tanto en el las células endoteliales como en las musculares se expresan receptores de testosterona (Kim-Schulze y col., 1996; Thompson y col., 2000), en diversos lechos vasculares, dependiendo del género. Su localización subcelular se puede ver modulada por agonistas y antagonistas específicos de estos receptores (Tabla 1). Además, se ha descrito un aumento de la expresión del mRNA del receptor de andrógenos en un tratamiento combinado con testosterona y estradiol, lo cual sugiere una acción colaboradora de ambos en la expresión del receptor de andrógenos (Wynne y Khalil, 2003).

Tabla 1: Distribución, agonistas y antagonistas de los receptores de testosterona en endotelio y músculo liso vascular (adaptado de Orshal y Khalil, 2004).

Testosterona	
Distribución en el vaso sanguíneo	Aorta de ratón Aorta de rata Aorta y coronaria de conejo Aorta bovina Coronaria de primate
Distribución subcelular	
Membrana plasmática	+
Citosol	+
Núcleo	+
Mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas	Indeterminado
Agonistas	Testosterona Dihidrotestosterona Dehidroepiandrosterona Androstenediona
Antagonistas	Flutamida, hidroxiflutamida Casodex

▪ Efectos vasodilatadores de los andrógenos

Se sabe que las hormonas sexuales ejercen un papel de regulación del tono vascular por modificación de la síntesis, liberación o bioactividad de factores endoteliales como NO, PGI₂ y EDHF:

- Se ha podido observar en coronaria de perro que la administración de testosterona puede inducir vasodilatación debida en parte a una liberación de NO endotelial (Chou y col., 1996). La BK, por ejemplo, aumenta la [IP₃]_i y estimula una rápida liberación de Ca²⁺. El tratamiento con testosterona bloquea este efecto de la BK y, por tanto, la producción de NO en cultivos de células endoteliales de rata (Rubio-Gayosso y col., 2002). También se ha observado

que andrógenos como la dehidroepiandrosterona (DHEA) desencadenan la síntesis de NO aumentando la expresión y estabilización de eNOS mediante un proceso dependiente de MAPK, pero no de PIP₃ quinasa o AKT (Simoncini y col., 2003b).

Sin embargo, existen estudios que demuestran que la relajación inducida por testosterona no se ve modificada en presencia de inhibidores de la síntesis de NOS o GC (Yue y col., 1995; Honda y col., 1999; Deenadayalu y col., 2001). Se ha descrito que la testosterona, aunque no influye en la liberación de NO, es capaz de aumentar la sensibilidad del músculo liso vascular al NO. Por ejemplo se ha demostrado una disminución del efecto vasodilatador de la ACh en ratones feminizados, en los que hay bajos niveles de testosterona (Jones y col., 2003), y un aumento de la respuesta vasodilatadora a nitroglicerina cuando se administra de forma exógena (Kang y col., 2002). Esta acción puede deberse a un aumento en los niveles de cGMP o PKG (Deenadayalu y col., 2001).

- PGI₂ es un factor relajante dependiente de endotelio que proviene del metabolismo del ácido araquidónico. Se ha descrito que los estrógenos pueden aumentar la síntesis de los productos de COX como PGI₂ (Geary y col., 2000). En cuanto a los andrógenos, tratamientos con testosterona en aorta de rata hembra han mostrado una disminución de la síntesis de PGI₂ (Wakasugi y col., 1989) y en cultivos de células musculares lisas de aorta de rata (Nakao y col., 1981).

Por otra parte, existen múltiples estudios que han investigado el efecto de prostanoïdes vasodilatadores en la respuesta a testosterona, mediante el uso del inhibidor inespecífico de COX indometacina, demostrando que no posee efecto inhibitorio sobre la relajación dependiente de testosterona (Yue y col., 1995; Chou y col., 1996; Honda y col., 1999).

- EDHF activa los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , produciendo así hiperpolarización y relajación del músculo liso. La testosterona puede promover hiperpolarización dependiente de endotelio de las células del músculo liso vascular, de forma dependiente de concentración. Esta relajación se puede producir de forma tanto dependiente como independiente de endotelio, e implica la acción de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y sensibles a ATP (Honda y col., 1999).

A pesar de todo, existen múltiples estudios que demuestran que la relajación debida a la testosterona no se ve modificada por la eliminación del endotelio (Yue y col., 1995; Honda y col., 1999; Deenadayalu y col., 2001; Perusquia y col., 1996; Perusquia y Villalón, 1999; Murphy y Khalil, 1999). Por lo tanto, en la respuesta vasodilatadora a testosterona han de estar implicados otros mecanismos vasodilatadores, como una apertura de canales de K^+ (Won y col., 2003; Tep-areenan y col., 2003), o una acción antagonista del Ca^{2+} (Perusquia y Villalón, 1999; Crews y Khalil, 1999).

▪ Efectos vasoconstrictores de los andrógenos

Estudios con animales de experimentación han demostrado, desde hace tiempo, que tras un tratamiento *in vivo* con andrógenos las respuestas vasoconstrictoras están incrementadas (Bhargava y col., 1967; Greenberg y col., 1974). Estos datos nos llevan a pensar que una terapia con testosterona incrementa la respuesta vasoconstrictora vascular, que puede deberse a modulación tanto de factores endoteliales, como de la maquinaria contráctil del músculo liso vascular.

- Los niveles basales de ET-1 son muy bajos. Sin embargo, factores de riesgo como hipertensión o diabetes incrementan su producción. Se ha demostrado que la ET-1 es liberada en menor proporción en hembras, lo cuál podría explicar el menor tono vascular y presión arterial en hembras que en machos (Kahonen y col., 1998).

La ET-1 se puede unir a dos tipos de receptores, ET_A y ET_B, que pueden ser tanto musculares como endoteliales. La activación del receptor ET_B endotelial puede provocar la liberación de NO. Sin embargo, la estimulación de ambos tipos de receptores en las células del músculo liso vascular activa mecanismos de contracción. Esta activación en machos que en hembras, lo cual puede deberse a un cambio funcional al receptor ET_B (Tostes y col., 2000).

También se ha demostrado que la testosterona incrementa la respuesta contráctil inducida por ET-1 en aorta torácica de conejo (Ammar y col., 2004) y en coronaria de cerdo (Teoh y col., 2000b).

- Se ha podido observar que un tratamiento con testosterona está asociado con un incremento de la contracción de la arteria coronaria de cerdo al análogo de TXA₂ U46619 (Schorr y col. 1994). Asimismo se han descrito diferencias en la liberación de factores vasoconstrictores dependientes de COX, como el TXA₂, que es mayor en machos que en hembras en situación experimental de hipertensión (Kahonen y col., 1998).

En lo que respecta a la privación de hormonas sexuales masculinas, se han encontrado resultados contradictorios dependiendo del lecho vascular estudiado, puesto que en arteria mesentérica se ha visto un incremento de la producción de TXA₂ tras la orquidectomía (Blanco-Rivero y col., 2006), mientras que en arteria cerebral se ha visto un aumento de dicho prostanoide vasoconstrictor en ratas orquidectomizadas tratadas con testosterona (Gonzales y col., 2005).

- La contracción de las células musculares lisas se desencadena por un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ debida a una liberación inicial de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y una entrada mantenida de Ca^{2+} del espacio extracelular (Murphy y Khalil, 2000). Además, la activación de PKC, MLCK, RhoK y MAPK, así como la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina contribuyen a la contracción del músculo liso (Horowitz y col., 1996; Somlyo y

Sonmlyo, 2000). Esta activación de PKC puede producirse por el aumento de DAG producida por la ruptura de fosfolípidos de membrana debida a la acción de agonistas α -adrenérgicos como la Phe (Kanashiro y Khalil, 1998b).

El Ca^{2+} es fundamental para iniciar la contracción del músculo liso vascular. Por eso se ha estudiado el efecto de las hormonas sexuales sobre la movilización de Ca^{2+} (Zhang y col., 1994, Murphy y col., 2000).

La longitud en reposo de las células del músculo liso vascular y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es menor en hembras que en machos. Esto parece deberse a los estrógenos, puesto que aumenta en hembras ovariectomizadas y no varía en machos orquidectomizados (Murphy y col., 2000).

La despolarización de la membrana por KCl estimula la entrada de Ca^{2+} . La razón de las diferencias que se encuentran en esta contracción debidas al género no están claras, pero puede deberse a diferencias en la densidad de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, o a su permeabilidad al Ca^{2+} dependiendo de la presencia o ausencia de estrógenos. Esto se ha podido comprobar en células cardíacas de ratones deficientes en receptores de estrógenos, en las que aumenta la expresión de canales de Ca^{2+} tipo L. Además, la corriente de Ca^{2+} tipo L es mayor en machos que en hembras (Johnson y col., 1997; Bowles, 2001).

- PKC está implicada en la respuesta a múltiples agonistas contráctiles, como ET-1, angiotensina II, TXA_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$. Sólo las isoformas α , β , δ , ϵ y ζ de PKC median la contracción del músculo liso vascular, variando la isozima específica implicada en cada respuesta dependiendo del lecho vascular, el agonista, la especie, el calibre de la arteria, etc (Lee y col., 1999; Dallas y Khalil, 2003). Las vías de señalización a través de las cuales PKC media la contracción implican alteraciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular, bien mediante activación de canales de Ca^{2+} o inhibición de canales de K^+ , o indirectamente mediante fosforilación de la cadena pesada de la miosina (Fulginiti y col., 1993).

Los ésteres de forbol y la fenilefrina (Phe) producen mayor contracción en vasos aislados intactos de ratas de las cepas WKY y SHR machos que de hembras (Kanashiro y Khalil, 2001). Estas diferencias en la contracción del músculo liso vascular debidas al género pueden deberse a diferencias en la vía mediada por PKC, pudiendo encontrarse estas diferencias tanto en la cantidad de PKC expresada en el músculo liso vascular, como en la sensibilidad de la ruta de transducción de señales de PKC a las hormonas sexuales endógenas (Kanashiro y Khalil, 2001).

La actividad de PKC se puede ver modificada por los andrógenos de distintas formas. Así, se ha descrito en próstata una disminución de la actividad de la PKC en animales orquidectomizados, que coincide con una disminución en la expresión de varias de sus isoformas (Montalvo y col., 2002). En tejido vascular, se han encontrado resultados contradictorios, pudiendo observarse una no modificación (Kanashiro y Khalil., 2001) y una disminución de la actividad (Blanco-Rivero y col., 2005a) de la PKC.

Además, la PKC puede modificar la respuesta de distintos factores vasoactivos importantes en la regulación del tono vascular, como un aumento en la sensibilidad al Ca^{2+} y a la reactividad vascular debida a agonistas α_2 -adrenérgicos (Carter y Kanagy, 2003), o la sensibilidad al al análogo de TXA_2 U46619 (Ding y Murray, 2005).

Adicionalmente, no hay que olvidar que la PKC no sólo está implicada en la regulación de la maquinaria contráctil, sino que además modula la síntesis de distintos factores vasoactivos como NO (Nakane y col., 1991; Li y col., 1998; Onoue y col., 2002; Yakubu y col., 2004; Blanco-Rivero y col., 2005a), prostanoïdes (Schuette y Lapointe, 2000; Cosentino y col., 2003), etc, así como la liberación de neurotransmisores (Ferrer y col., 1992; Turner y col., 1996; Goodall y col., 1997), regulando a través de estos mecanismos el tono vascular.

En resumen, el efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la función vascular es variado, e incluso contradictorio, por lo cual está siendo objeto de revisiones de gran interés (Jones y col., 2004a; Orshal y Khalil, 2004; Thompson y Khalil, 2003). Teniendo en cuenta que la circulación mesentérica juega importante papel en el control de la presión sanguínea sistémica, y que en la regulación del tono vascular de esta arteria intervienen factores endoteliales y nerviosos, es importante estudiar cómo las hormonas sexuales masculinas modulan las respuestas vasomotoras inducidas por estimulación eléctrica y acetilcolina, que producen la liberación de dichos factores.

Objetivos

Los objetivos concretos planteados en el siguiente trabajo han sido analizar, en la arteria mesentérica de ratas macho, la influencia de las hormonas sexuales masculinas sobre:

1. la liberación, respuesta y/o metabolismo del NO neuronal, valorando:
 - a. la participación del NO neuronal en la respuesta vasomotora inducida por estimulación eléctrica.
 - b. la expresión de nNOS.
 - c. el NO liberado por estimulación eléctrica.
 - d. la producción de aniones superóxido y peroxinitritos
 - e. la participación de las anteriores sustancias en la respuesta vasomotora al donante de NO, nitroprusiato sódico.
2. la liberación y función del NO endotelial, valorando:
 - a. la participación del NO endotelial en la respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina.
 - b. la expresión de eNOS.
 - c. la liberación de NO endotelial inducida por acetilcolina.
 - d. la participación de otras sustancias, como aniones superóxido y tromboxano A₂, en la respuesta vasomotora inducida por acetilcolina.
3. la actividad de PKC.
4. el posible efecto regulador de PKC sobre la liberación y la función del NO neuronal y endotelial.

Materiales y Métodos

1. Mantenimiento de animales y protocolos

Para este estudio se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 6 meses de edad. Dichos animales se dividieron en dos grupos experimentales: ratas controles y orquidectomizadas. Todos los animales se mantuvieron en el animalario de la Universidad Autónoma de Madrid (Número de Registro EX-021U) de acuerdo con las directivas 609/86 CEE y R.D. 233/88 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España. La privación de las hormonas sexuales masculinas se indujo por gonadectomía a las 7 semanas de edad, y posteriormente el animal fue sacrificado 4 meses después. A la edad de 6 meses se midió la presión arterial de forma indirecta mediante el método de pletismografía de arteria caudal (método de "tail cuff" descrito por Buñag (1974). La observación de la atrofia de las vesículas seminales confirmó la efectividad de la cirugía. Las ratas se sacrificaron mediante inhalación de CO₂; posteriormente se extrajo cuidadosamente la arteria mesentérica superior, se limpió de tejido conectivo y se almacenó en solución Krebs-Henseleit (KHS, en mM: NaCl 115; CaCl₂ 2,5; KCl 4,6; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄·7H₂O 1,2; NaHCO₃ 25; glucosa 11,1; Na₂ EDTA 0,03) a 4° C. La investigación se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de Guide for the Care and Use of Laboratory Animals publicada por USA National Institutes of Health (NIH publication N° 85.23 revised 1985).

2. Ensayo de actividad PKC

Se diseccionaron segmentos de arteria mesentérica de ambos grupo de animales, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. La actividad PKC se determinó utilizando el kit comercial Non-Radioactive Protein Kinase Assay Kit (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Germany). Las arterias congeladas se homogeneizaron en un tampón compuesto por 50 mM pH 7,4 Tris-HCl, 10 mM

benzamidina, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 50 mM β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF, y se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min a 4°C.

El sedimento se solubilizó en NaOH 2M para medir el contenido proteico, utilizando el kit comercial DC protein assay kit (BioRad), basado en un ensayo colorimétrico similar al ensayo de Lowry (Lowry y col, 1951). El ensayo consiste en la reacción de las proteínas con una solución alcalina de tartrato sódico con el reactivo de Folin, y sigue dos pasos: la reacción entre la proteína y el cobre en medio alcalino, y la consecuente reducción del reactivo de Folin por acción de las proteínas tratadas con cobre. El desarrollo del color se debe principalmente a los aminoácidos tirosina y triptófano, y en menor medida a cistina, cisteína e histidina (Lowry y col, 1951, Peterson y col, 1979). Las proteínas ejercen una reducción en el reactivo de Folin por pérdida de 1, 2 ó 3 átomos de oxígeno, produciendo así una o más especies reducidas con un color azul característico, con un máximo de absorción a 750 nm y un mínimo a 405 nm. Dicha lectura se realizó en un lector de placas (Multiskan Ascent, Labsystems) utilizando el programa Ascent Software. La concentración de proteínas se determinó por interpolación en una curva patrón elaborada a partir de distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA).

El sobrenadante se recogió y utilizó en el ensayo. La actividad PKC se midió siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Brevemente, las muestras se añadieron a un tampón de reacción compuesto de 250 mM pH 7,0 Tris-HCl, 30 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 50 mM β -mercaptoetanol, 1 mM ATP en los grupos de reacción positivo y negativo, y 20 mM $CaCl_2$ y 500 $\mu g/ml$ fosfatidilserina en el grupo de reacción positiva, se transfirieron a una placa ELISA cubierta un péptido pseudosustrato, y se incubó durante 20 minutos a 25°C. La reacción se paró y tras los lavados, se incubó la placa 60 minutos a 25°C con un anticuerpo biotinilado contra el pseudosustrato fosforilado, y posteriormente, otra hora con estreptavidina conjugada con peroxidasa también a 25°C. Posteriormente se añadió la solución

sustrato durante 5 minutos, se paró la reacción y se leyó la placa a 492 nm en un lector de placas. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias/mg proteína.

3. Reactividad vascular

El método utilizado para medir la tensión isométrica ha sido descrito previamente por Nielsen y Owman (1971). Brevemente, el método consiste en introducir dos alambres de acero a través del lumen del segmento del vaso, uno de ellos fijo a la pared del baño y el otro conectado a un transductor de fuerza (Grass FTO3C; Quincy, Mass, USA), conectado éste a su vez a un polígrafo Grass modelo 7D (Figura 8). Para los experimentos en los que se estudió la función de las distintas inervaciones, los segmentos arteriales se montaron entre dos electrodos de platino separados 0,5 cm y conectados a un estimulador eléctrico (Grass, modelo S44) modificado para proporcionar una corriente adecuada para el ensayo posterior. Los segmentos se introdujeron en un baño de órganos que contenía KHS a 37° C burbujeado continuamente con una mezcla de 95% O₂-5% CO₂ (pH 7,4).

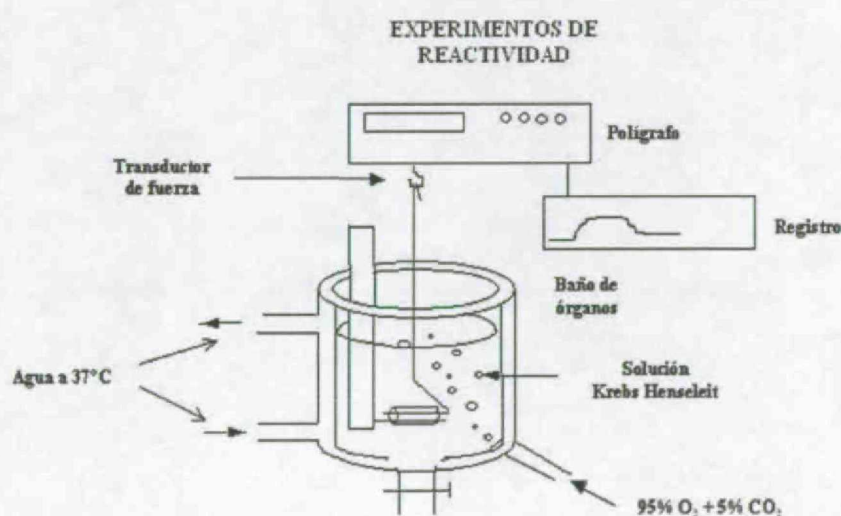


Figura 8: Esquema representativo del sistema de reactividad vascular utilizado en el presente estudio

En el presente estudio se realizaron experimentos en arterias mesentéricas con y sin endotelio. El endotelio se eliminó frotando la superficie luminal de los segmentos. Los segmentos se sometieron a una tensión de 0,5 g, siendo reajustada cada 15 minutos durante el periodo de estabilización de 90 min previo a la administración de fármacos. Tras este periodo las arterias se expusieron a 75 mM KCl para comprobar su integridad funcional. Posteriormente, se comprobó la presencia/ausencia de endotelio mediante la capacidad/incapacidad de 10 μ M de acetilcolina (ACh) para relajar segmentos precontraídos con 1 μ M de noradrenalina (NA).

3. a Participación del NO neuronal en la respuesta vasomotora

- En primer lugar, se midió la respuesta contráctil a estimulación eléctrica (EE) en segmentos arteriales desendotelizados para eliminar la fuente principal de NO endotelial, y evitar así malinterpretaciones de los resultados obtenidos. Se realizaron curvas frecuencia-respuesta a EE (1, 2, 4, 8 y 16 Hz) y curvas concentración-respuesta a NA (10 nM-10 μ M). Los parámetros utilizados para realizar los experimentos de EE fueron 200 mA, 0,3 ms, 1-16 Hz, durante 30 s, con un intervalo de 1 min entre cada estímulo, tiempo requerido para recuperar el tono basal. Un periodo de lavado de por lo menos 1 hora fue necesario para evitar la desensibilización entre curvas consecutivas. Tres curvas consecutivas separadas por intervalos de 1 h produjeron respuestas contráctiles similares. Para determinar la participación de la inervación α -adrenérgica, cuando se ensayó el efecto de 0,1 μ M de tetrodotoxina (TTX, bloqueante de los canales de Na^+ y, por tanto, de la transmisión del impulso nervioso) o de 1 μ M fentolamina (antagonista de los receptores α -adrenérgicos) en la contracción producida por EE, dichas sustancias se añadieron al baño de órganos 30 min antes de realizar el experimento.
- Para determinar la participación de NO neuronal en la respuesta a EE y/o NA en ambos grupos de ratas, se añadió al medio 10 μ M N^ω-nitro-L-arginina metil ester

(L-NAME) o 5 nM de 2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiacina (AMT), inhibidores de la NOS constitutiva e inducible, respectivamente, 30 min antes de realizar la segunda curva frecuencia-respuesta o antes de la curva concentración-respuesta a NA.

- Para analizar la posible participación de la inervación sensorial en la respuesta inducida por EE en machos control y orquidectomizados, se añadió al medio 0,5 μ M de la neurotoxina sensorial capsaicina 60 minutos antes de realizar la segunda curva a EE, o la segunda curva a NA.
- Para analizar posibles diferencias en la ruta de señalización de NO, se analizó la capacidad del donante de NO nitroprusiato sódico (SNP, 10 nM–10 μ M) y del análogo de cGMP 8-bromo-GMP cíclico (8-Br-cGMP, 0,1 μ M–0,1 mM) de inducir relajación en segmentos de ambos grupos experimentales precontraídos con 1 μ M de NA.
- Para analizar el efecto de los aniones superóxido y el H₂O₂ en la respuesta inducida por el SNP, se realizaron curvas de este fármaco en segmentos de machos control y orquidectomizados, en presencia del secuestrador de aniones superóxido, superóxido dismutasa (SOD, 13 U/ml) o del inactivador de H₂O₂, catalasa (1000 U/ml). La respuesta a SNP en presencia simultánea de ambos fármacos se realizó sólo en machos orquidectomizados.
- En segmentos precontraídos con NA de machos control y orquidectomizados se estudió el efecto vasodilatador de peroxinitrito (1 μ M–0,3 mM) y H₂O₂ (10 μ M–1 mM) exógenos.

3. b Participación del NO endotelial en la respuesta vasomotora

- Para estudiar la influencia de las hormonas sexuales masculinas sobre la función del NO endotelial, se analizó la respuesta vasodilatadora inducida por ACh (0,1 nM- 10 μ M) y por SNP (0,1 nM- 10 μ M) en arterias mesentéricas con endotelio de ambos grupos experimentales. Para estudiar la contribución del NO endotelial en la respuesta vasodilatadora a ACh, se realizaron curvas de relajación a ACh (0,1 nM- 10 μ M) en presencia de 10 μ M de L-NAME.
- Para determinar si existían diferencias en las respuestas inducidas por TXA₂ y NO entre arterias de ambos grupos, se realizaron curvas concentración-respuesta al mimético de TXA₂ ácido (15)-hidroxi-11 α , 9 α -(epoximetano) prosta-5,13-dienoico (U-46619, 1nM-1 μ M) o al donante de NO nitroprusiato sódico (SNP, 0,1nM - 10 μ M) en arterias de machos controles y orquidectomizados.

3. c Participación de la PKC sobre la función del NO neuronal y endotelial

- Para estudiar la posible implicación de PKC en la respuesta al NO liberado por EE, 1 nM de 12, 13-forbol dibutirato (PDBu, activador de PKC) o 0,1 μ M de calfofistina C (inhibidor no selectivo de PKC) se añadieron al baño 30 min antes de la segunda curva frecuencia-respuesta en arterias de ambos grupos de animales. En arterias de machos orquidectomizados también se utilizó una concentración mayor de calfofistina C (0.5 μ M). Para determinar la participación de NO en la respuesta a EE cuando PKC esté activada o inhibida, se realizó una tercera curva frecuencia-respuesta en presencia de PDBu o calfofistina C con L-NAME.
- Para analizar el posible efecto de PDBu o calfofistina C sobre la respuesta inducida por NO, se realizaron curvas concentración-respuesta con el donante de NO

nitroprusiato sódico (SNP, 10 nM-10 μ M) en segmentos sin endotelio de ratas controles y orquidectomizadas precontraídas con 1 μ M NA, en presencia o ausencia de PDBu o calfofina C.

- Para determinar la posible implicación de PKC sobre el papel funcional del NO en la respuesta inducida por ACh, se añadieron 1 nM de PDBu o 0.1 μ M de calfofina C al baño 30 min. antes de realizar la curva concentración-respuesta a ACh (0,1 nM- 10 μ M) en segmentos arteriales de ambos grupos experimentales. Para analizar la isoforma específica implicada en la respuesta inducida por ACh en arterias de machos orquidectomizados, se añadieron 30 minutos antes de realizar la curva concentración-respuesta a ACh 1 μ M del inhibidor de las isoformas nóveles y clásicas Gö6976 o 10 μ M del inhibidor específico de la isoforma atípica PKC ζ PKC ζ -PI. Para determinar la posible presencia de sustancias vasodilatadoras distintas al NO en la respuesta a ACh, inducidas por la activación de PKC, se ensayó en arterias procedentes de machos orquidectomizados el efecto de PDBu junto con L-NAME sobre la respuesta vasodilatadora inducida por ACh.
- Para analizar el posible efecto de PDBu o calfofina C sobre la respuesta inducida por el NO, se realizaron curvas concentración-respuesta a SNP en segmentos de ambos grupos experimentales precontraídos con NA, en presencia o ausencia de PDBu o calfofina C. Además, se ensayó el posible efecto de 1 μ M de Gö6976, selectivo de las isoformas convencionales frente a las nóveles y atípicas, o 10 μ M del pseudosustrato inhibidor de PKC- ζ (PKC ζ -PI) sobre la curva-dosis respuesta a SNP en arterias de machos orquidectomizados.

4. Liberación de óxido nítrico

La liberación de NO por parte de las arterias se midió utilizando el indicador fluorescente de NO 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) según el protocolo descrito por Martín y col. (2005). Este compuesto penetra en las células, donde es hidrolizado por las esterasas citosólicas y queda atrapado por el citosol en forma de 4,5- diaminofluoresceína (DAF2). Ésta a su vez reacciona con el NO para formar el producto fluorescente triazolfluoresceína (DAF-2T), cuantificable mediante la utilización de un filtro de excitación de 492 nm y un filtro de emisión de 515 nm (Figura 9).

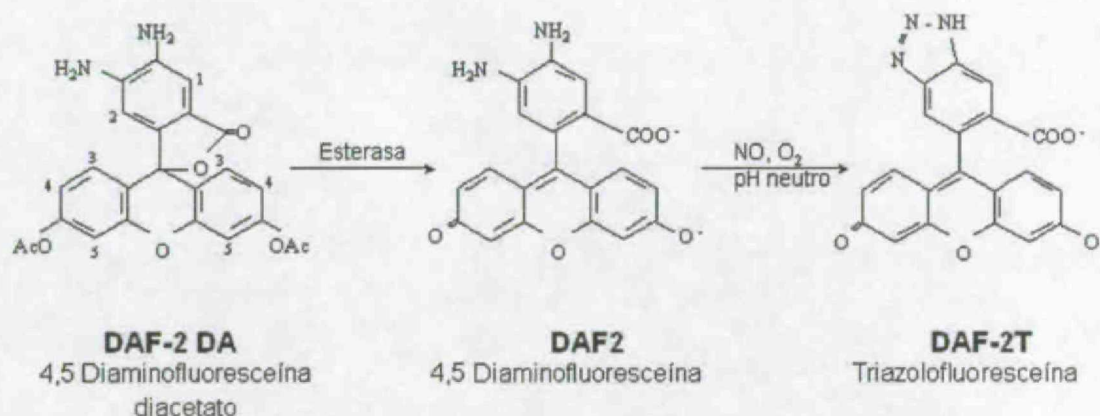


Figura 9: Metabolismo de la diaminofluoresceína, indicador fluorescente de la presencia de NO.

Para realizar este experimento se sometieron arterias mesentéricas de ambos grupos de animales a la tensión adecuada, indicada en el apartado *Reactividad vascular*. Tras un periodo de equilibrado de 45 min en buffer HEPES (en mM: NaCl 119; HEPES 20 mM; CaCl₂ 1,2; KCl 4,6; KH₂PO₄ 0,4; MgSO₄ 1; NaHCO₃ 5; glucosa 5,5; Na₂HPO₄ 0,15; pH 7,4) a 37° C, las arterias se incubaron con 0,5 μM DAF-2 DA

durante 45 min. Se recogió el medio para medir la liberación basal de NO. Una vez el baño fue rellenado, se realizaron estimulaciones con curvas frecuencia-respuesta a EE en **arterias sin endotelio** y curvas de concentración-respuesta a Ach en **arterias con endotelio**. La fluorescencia del medio se midió a temperatura ambiente utilizando un espectrofluotrimetro (LS50 Perkin Elmer instruments, FL WINLAB Software). La liberación de NO inducida por estimulación se calculó sustrayendo la liberación basal de NO de la producida por el estímulo. Se realizaron también medidas de medio sin **arteria (blanco)** para restar la emisión de fondo. Se realizaron también varios ensayos en presencia de L-NAME (10 μ M) para asegurar la especificidad del método. La cantidad de NO liberada se expresó en unidades arbitrarias/mg tejido.

La interferencia de PDBu (1 nM), calfofina C (0,1 μ M), Gö6976 (0,1 μ M) o PKC ζ -PI (10 μ M) en la liberación de NO se analizó incubando las arterias con dichos fármacos 30 min antes de recoger el medio para determinar la liberación de NO basal o estimulada.

5. Liberación de ^3H -NA

Segmentos sin endotelio de **arteria mesentérica superior** de animales de ambos grupos experimentales se estabilizaron en 5 ml de solución KHS a 37° C, burbujeada con carbógeno durante 30 minutos. Posteriormente, los segmentos se incubaron durante 1 hora en 1,5 ml de KHS que contenía [^3H]-NA (0,33 μ M, 10 μ Ci/ml, actividad específica 10 Ci/mmol), mantenida a 37° C y burbujeada con carbógeno. Los segmentos se transfirieron a una cámara de perfusión con dos electrodos de platino paralelos entre sí y separados 0,5 cm, donde se perfundieron continuamente con la solución de KHS. Esta solución fue mantenida a 37° C y burbujeada con carbógeno, con un flujo de 2 ml/minuto que se consiguió mediante una bomba peristáltica.

Tras un periodo de lavado de 90 minutos, en el que se alcanzó una liberación basal de tritio estable, los segmentos fueron sometidos a un periodo de EE de 60 segundos de duración (200 mA, 0,3 ms, 4 Hz) cada uno, realizado tras el periodo de lavado. Se recogieron muestras del efluente cada 30 s de la siguiente manera:

- 3 muestras previas al estímulo para determinar el nivel basal de liberación de tritio.
- 2 muestras correspondientes al periodo de EE de 60 s.
- 5 muestras posteriores al EE a intervalos de 30 s.

A cada vial se le añadieron 2 ml de líquido de centelleo OpticPhase "HiSafe" (Wallac) para medir el contenido de tritio (cpm) presente en las muestras en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 5000 TD).

Una vez finalizado el experimento, se determinó el peso de los segmentos arteriales. La liberación basal de tritio corresponde a la media de la liberación obtenida en las tres muestras previas a la EE /mg tejido. La liberación de tritio inducida por EE se obtuvo sumando la radiactividad obtenida en las cinco muestras siguientes a cada periodo de EE, a los cuales se les restó la liberación basal/mg tejido.

6. Determinación de cGMP

Arterias mesentéricas de machos controles y orquidectomizados se sometieron a la tensión adecuada indicada en los experimentos de *Reactividad vascular*. Tras un periodo de equilibrado de 60 minutos, los segmentos se contrajeron con NA durante 3 minutos (nivel basal) y posteriormente algunos segmentos se incubaron con 0,1 μ M SNP durante 10 s. Los segmentos se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -70° C. Los niveles de cGMP se determinaron utilizando el kit comercial Cyclic GMP Enzyme immunoassay Kit de Assay Designs, Inc. Para este ensayo, las arterias

congeladas se homogeneizaron en 0,1 M HCl y centrifugaron a 600 x g durante 10 min a 4°C. El sedimento se solubilizó en NaOH 2M para medir el contenido proteico del modo indicado en el apartado *Ensayo de actividad PKC*. El sobrenadante se recogió y utilizó en el ensayo.

Los niveles de cGMP se midieron siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se acetilaron las muestras con un volumen de anhídrido acético y dos volúmenes de trietilamina, se transfirieron a una placa ELISA recubierta con un anticuerpo de cabra específico contra IgG, y se incubaron toda la noche a 4° C junto con un anticuerpo contra cGMP y un antisuero de fosfatasa alcalina conjugada a cGMP. Tras realizar varios lavados, se añadió una solución de p-nitrofenil fosfato durante una hora para revelar la reacción. Finalmente se paró la reacción y se leyó la placa a 405 nm utilizando un lector de placas ELISA. Los resultados se calcularon mediante interpolación en una curva de cantidades conocidas de cGMP, y se expresaron en pmol cGMP/mg proteína.

7. Determinación de aniones superóxido

Los niveles de aniones superóxido se midieron utilizando la quimioluminiscencia emitida por la lucigenina, como describieron Pagano y col. (1995) y Wang y col. (1999), y ha sido adaptado en nuestro grupo por Martín y col. (2005). Brevemente, el protocolo consiste en estabilizar segmentos de arteria mesentérica durante 30 minutos en KHS. Posteriormente se estabilizan los segmentos en buffer HEPES a 37 °C. Las arterias se transfirieron a 1 mL de buffer HEPES con lucigenina (250 µM) y se mantuvieron a 37° C. El luminómetro se programó para expresar unidades arbitrarias de luz emitida; se realizaron medidas repetidas durante 5 minutos en intervalos de 10 segundos, y se realizó una media aritmética de dichas medidas. Se utilizó ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benceno-disulfónico "Tyron" (10 mM), secuestrador de aniones

superóxido permeable a la membrana celular, para confirmar la quimioluminiscencia dependiente de aniones superóxido. Además, se tomaron medidas del medio en las mismas condiciones sin segmentos de arteria para así restar la emisión de fondo.

8. Determinación de peroxinitritos

Se utilizó la oxidación de dihidrorodamina-123 como un método de detección indirecto de formación de peroxinitritos (Pfeiffer y col, 2001). Las arterias fueron lavadas tres veces con PBS y posteriormente incubadas en PBS con 0,1 mM del quelante de metales ácido dietilentriamino-pentacético, y 0,1 mM de dihidrorodamina-123 a 37°C; en otro grupo de experimentos, se añadió 0,1 μ M SNP. Se recogió el medio y se midió la absorbancia a 500 nm. Se recogieron también muestras de medio incubadas sin tejido, en presencia y ausencia de 0,1 μ M SNP, para así restar la absorbancia debida al medio. La oxidación de dihidrorodamina-123 se calculó usando un coeficiente de extinción de $78,800 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}$ a 500 nm .

9. Expresión de nNOS, eNOS y TXA₂ sintasa

9. a Preparación de muestras

Las muestras fueron homogeneizadas del modo descrito en el apartado *Ensayo de actividad PKC*, en un tampón que contiene 1 mM de vanadato sódico, 1% SDS y 0,01 M pH 7,4 Tris-HCl. Tras la determinación proteica, siguiendo los pasos descritos en el apartado *Ensayo de actividad PKC*, en la fracción soluble del homogenado, las proteínas a separar se extrajeron en un tampón de rotura y solubilización, tampón Laemmli, en el que se resuspendieron estos extractos. El tampón Laemmli (Laemmli, 1970) contiene 0,01 % azul de bromofenol; 100 mM ditiotreitolo; 0,1% glicerol;

2% SDS y 60 mM Tris-HCl pH 6,8. Las muestras se llevaron a ebullición durante 10 minutos, y se tomó el volumen adecuado para introducir 20 µg de proteínas totales de cada muestra en los pocillos del gel.

9. b Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, usando SDS 10% (p/v) como detergente (Laemmli, 1970). La concentración de poliacrilamida en el gel de separación fue del 7,5% (p/v) para eNOS y nNOS, y del 8,5% para TXA₂ sintasa, mientras que en el gel de concentración fue del 5% (p/v). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 97 V en un Mini-PROTEAN 3 CELL (Bio-Rad).

9. c Electrotransferencia y detección inmunológica

Las muestras ya separadas se transfirieron electroforéticamente ("western blot") a un soporte sólido, consistente en una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Bio Rad Immun-Blot ®) de 0,2 µm de diámetro de poro, en un aparato de transferencia vertical (Mini Trans-Blot, BioRad), usando como tampón de transferencia Tris 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y metanol 20% (v/v).

Una vez transferidas las muestras e inmovilizadas en la membrana de PVDF, se procedió a la detección inmunológica según el siguiente protocolo:

- Se bloqueó la membrana en TBS (100 mM pH 7,4 Tris-HCl, 0,9% p/v NaCl, 0,1% SDS) con leche en polvo desnatada al 5% p/v (tampón de bloqueo) durante 1 hora.
- Se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido, según el título del mismo, en tampón de bloqueo durante 1:30 horas a temperatura ambiente. En esta determinación como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo monoclonal anti-

eNOS (1:1000, Transduction Laboratories, Lexington, UK), un anticuerpo monoclonal anti-nNOS (1:2500, Transduction Laboratories, Lexington, UK), o un anticuerpo policlonal anti-TXA₂ sintasa (1:500, Cayman Chemical, USA)

- Se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo o ratón, obtenido en cabra, conjugado con actividad peroxidasa de Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, diluido 1:1000), en TBS-Tween durante 1:30 horas a temperatura ambiente.
- Para revelar, se utilizó un kit ECL™, siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), mediante auto-radiografía (Hyperfilm ECL, Amersham International Plc).
- La misma membrana se utilizó para determinar la expresión de α -actina, utilizada para corregir la expresión de cada muestra, utilizando un anticuerpo monoclonal anti α -actina (1:3000, Sigma-Aldrich, Spain).

El análisis de las bandas obtenidas se realizó mediante el programa Scion Image for Windows (© 2000 Scion Corporation).

10. Detección inmunohistoquímica de TXA₂ sintasa

Arterias mesentéricas de machos controles y orquidectomizados se fijaron en una solución de 4% formaldehído, 0,5% ácido acético y 0,1 M tampón fosfato, y posteriormente se crioprotegieron con una solución de sacarosa al 30% p/v en PBS. Posteriormente se cortaron las arterias embebidas en OCT Tissue Tek® en secciones de 20 μ m y se realizó el siguiente protocolo:

- Inhibición de las peroxidasas endógenas con H₂O₂ 0,3% en metanol durante 5-30 minutos
- Bloqueo durante 1h con PBS con 1% de BSA y 0,2% triton x100.

- Incubación con el anticuerpo primario contra TXA₂ sintasa (1:100, Cayman Chemical, USA) durante toda la noche a 4° C en agitación en PBS con 1% de BSA y 0,2% triton x100.
- Incubación durante 3h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario ALEXA FLUOR 546 goat anti-rabbit (1:1000, Molecular Probes) en agitación.

Las secciones se montaron con glicerol al 60% y se cubrieron para realizar fotografías mediante un microscopio confocal LEICA (TCS ST2 DM IRE2) (excitación 546 nm, emisión 580 nm). El láser y los parámetros de la imagen se dejaron fijos para la adquisición de las fotografías de los machos control y orquidectomizados. Las imágenes muestran la intensidad y localización del anticuerpo secundario, que refleja la expresión de TXA₂ sintasa, con lo cual se puede realizar una comparación entre ambos grupos experimentales.

11. Producción de TXA₂

La producción de TXA₂ *in vivo* se mide normalmente a través de su metabolito estable Tromboxano B₂ (TXB₂), utilizando el kit comercial TXB₂ Immunoassay (R&D Systems). Segmentos de arteria mesentérica de ambos grupos de ratas se preincubaron durante 30 minutos en 5 mL de KHS a 37° C, burbujeado continuamente con una mezcla de 95% O₂- 5% CO₂ (periodo de estabilización). Tras varios periodos de lavado en un baño de 0,2 mL de KHS se recogió el medio para medir la liberación basal de TXB₂. Tras rellenar la camarita, las arterias se expusieron a concentraciones crecientes y acumulativas de ACh (0,1 nM-10 µM) en intervalos de 2 min, de forma similar a como se realizaron las curvas concentración-respuesta explicadas en el apartado de *Reactividad vascular*.

Los distintos ensayos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, las muestras se transfirieron a una placa ELISA recubierta con un anticuerpo de cabra

específico contra IgG de conejo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con un anticuerpo específico de conejo contra TXB₂. Tras lavar, se añadió una solución de p-nitrofenil fosfato durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras parar la reacción la placa se leyó a 405 nm utilizando un lector de placas. Se utilizó un pocillo blanco para sustraer la señal de fondo. Los resultados se expresaron como pg TXB₂/mL mg tejido.

12. Productos químicos

Para este estudio se utilizaron ACh cloruro, calfofina C, catalasa, DAF-2, fentolamina, Gö6976, H₂O₂, HE, L-NA hidrocloreto, L-NAME hidrocloreto, lucigenina, PDBu acetato, peroxinitrito, PKC ζ -PI, SNP, SOD, TTX, tyron y U-46619. Todos ellos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich; España, o de las casas comerciales indicadas en el texto. Se realizaron soluciones madre (10 mM) de todos los fármacos en H₂O bidestilada, excepto la NA, que se disolvió en una solución de NaCl (0,9%)-ácido ascórbico (0,01% p/v), y el PDBu, la calfofina C y el Gö6976, que se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Se ha comprobado que el DMSO no altera ni el tono basal ni las respuestas inducidas por EE. Dichas soluciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Las diluciones apropiadas se realizaron en KHS el mismo día del experimento.

13. Análisis estadístico

Las respuestas realizadas por EE, KCl, U-46619 o NA se expresaron en mg de fuerza para poder realizar la comparación entre animales control y orquidectomizados. La relajación a Ach, SNP, 8BrcGMP, peroxinitrito y H₂O₂ se expresaron como porcentaje de la contracción inicial producida por la NA. Los resultados se expresaron como media \pm EEM (error estándar de la media).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA) comparando la curva obtenida en presencia de los distintos fármacos con la curva control o previa utilizando el test de análisis de la varianza (ANOVA), considerando estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Para los experimentos de liberación de NO, actividad PKC, formación de cGMP y TXA₂, y cuantificación de aniones superóxido y peroxinitritos, el análisis estadístico se realizó mediante el test de la t de Student para experimentos no pareados, considerando estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

1. Efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la presión arterial

Los niveles de presión arterial no se vieron modificados por la privación de hormonas sexuales (control: $142 \pm 6,6$ mm Hg; orquidectomizados: $130 \pm 5,2$ mm Hg; $p > 0,05$). Por lo tanto, los cambios en la liberación y función de algunos factores vasoactivos inducidos por la privación de hormonas sexuales masculinas observados en este estudio no van acompañados cambios hemodinámicos.

2. Efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la respuesta a KCl

La respuesta inducida por 75 mM de KCl se vio disminuida en segmentos de machos orquidectomizados (control, 1530 ± 93 , $n=30$; orquidectomizados, 1161 ± 73 mg, $n=42$, $p < 0,01$). Esto concuerda con estudios que demuestran que el tratamiento con testosterona favorece la acción de varios agentes contráctiles (Baker y col., 1978); por ejemplo, se ha podido observar un aumento en la respuesta contráctil a norepinefrina en machos castrados sometidos a un tratamiento con testosterona (Calderone y col., 2002), y una disminución de la respuesta contráctil inducida por KCl en arteria femoral de ratones feminizados (Jones y col., 2003). Asimismo, se ha demostrado un aumento en la respuesta contráctil a KCl en músculo liso vascular de arteria porcina de machos y hembras tratados con testosterona (Farhat y col., 1995). Sin embargo está en desacuerdo con otros autores que proponen que el tratamiento con testosterona produce una disminución de la respuesta contráctil a KCl (Jones y col., 2004b). Esta discrepancia puede ser debida a que en dicho estudio se analiza el papel de un tratamiento agudo de la testosterona, mientras que en nuestro estudio se analiza el efecto de la testosterona endógena, y que ambas investigaciones se han llevado a cabo en lechos vasculares distintos.

Por otra parte, la contracción del músculo liso vascular depende de la concentración de Ca^{2+} intracelular, que está regulada por la entrada de dicho ión a través de canales de Ca^{2+} (Nelson y col., 1990). La apertura de dichos canales depende del potencial de membrana (Nelson y col., 1990), que en músculo liso vascular está controlado principalmente por el flujo de K^+ (Yuan, 1995). Existen estudios que concuerdan con nuestros resultados, que demuestran una disminución de la contractilidad de cardiomiocitos de ratas Sprague-Dawley machos orquidectomizadas (Golden y col., 2003) debida a una regulación de la expresión del intercambiador Na/Ca . Sin embargo, contrastan con otros estudios en los que se ha podido observar una disminución de Ca^{2+} intracelular en arterias coronaria y femoral de conejo por acción de la testosterona (Won y col., 2003), o una disminución de la contractilidad del miocardio por bloqueo de los canales de Ca^{2+} de tipo L en presencia de epiandrosterona (Gupte y col., 2002). Por tanto, la menor respuesta contráctil a KCl podría indicar una disminución de la sensibilidad y/o una menor entrada al citoplasma de Ca^{2+} en las arterias de animales orquidectomizados. Sin embargo, no se puede descartar tampoco la participación de otras sustancias vasoactivas que modulen el efecto contráctil.

3. Efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la innervación de la arteria mesentérica

La arteria mesentérica de rata posee una rica innervación simpática (Li y Duckles, 1992), sensorial (Kawasaki y col., 1988) y nitrérgica (Boeckxstaens y Pelckmans, 1997, Marín y Balfagón, 1998), que participan en la regulación del tono vasomotor. Para estudiar la participación de dichas innervaciones en el lecho mesentérico, primeramente se analizó la respuesta vasomotora inducida por EE en arterias de ambos grupos de animales. Los resultados obtenidos mostraron que la EE inducía una

respuesta contráctil dependiente de la frecuencia utilizada, y que dicha respuesta fue similar en arterias de ambos grupos (Figura 10).

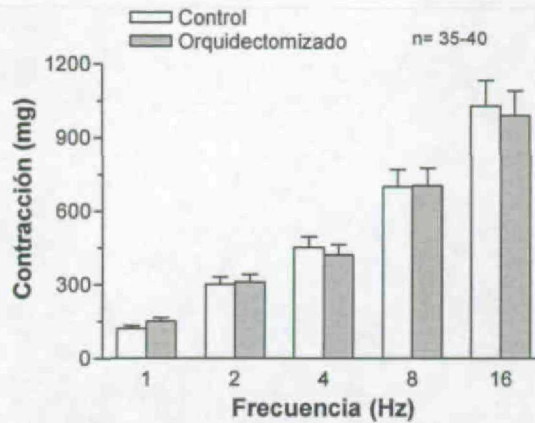


Figura 10: Registro de la tensión isométrica de las contracciones dependientes de frecuencia en segmentos de arteria mesentérica sin endotelio de animales control y orquidectomizados. Los resultados (media \pm EEM) se expresan en miligramos. n, número de animales.

Estas contracciones se vieron notablemente disminuidas en presencia de tetrodotoxina (0,1 μ M), que bloquea la propagación del impulso nervioso en segmentos de ambos grupos de ratas (Figura 11), lo cual indica que la respuesta debida a EE procede de la liberación de neurotransmisores.

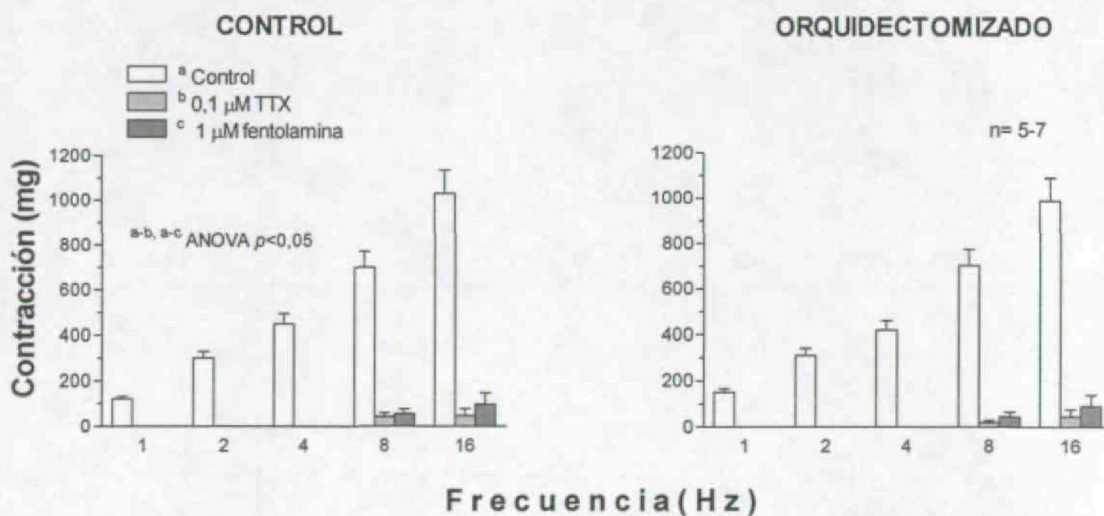


Figura 11: Efecto de 0,1 μ M de TTX y de 1 μ M de fentolamina sobre la respuesta a EE en arteria mesentérica sin endotelio de animales control (A) y orquidectomizados (B). Los resultados (Media \pm EEM) se expresaron en miligramos. n, número de animales.

3. a Inervación adrenérgica

La respuesta a EE en presencia del antagonista específico de los receptores α -adrenérgicos, fentolamina ($1 \mu\text{M}$), redujo notablemente la respuesta contráctil inducida por EE en ambos grupos de animales (Figura 11). Por lo tanto, podemos deducir que la inervación α -adrenérgica está implicada en la respuesta a EE, lo que indica que esta respuesta contráctil está provocada mayoritariamente a una liberación de NA de sus terminales nerviosos y posterior activación de receptores α -adrenérgicos, tal y como se ha descrito previamente en animales de la cepa utilizada en este estudio (Ferrer y col., 2000) y de otras cepas, como SHR (Ferrer y col., 2001), y WKY (Ferrer y col., 2004).

Para determinar si el neurotransmisor liberado a partir de dicha inervación, la NA, tiene distinta respuesta en ambos grupos de animales, se realizaron curvas concentración respuesta (10 nM - $10 \mu\text{M}$) a dicho fármaco, pudiéndose observar que la respuesta contráctil inducida por NA exógena fue mayor en segmentos de ratas control que en segmentos de ratas orquidectomizadas (Figura 12).

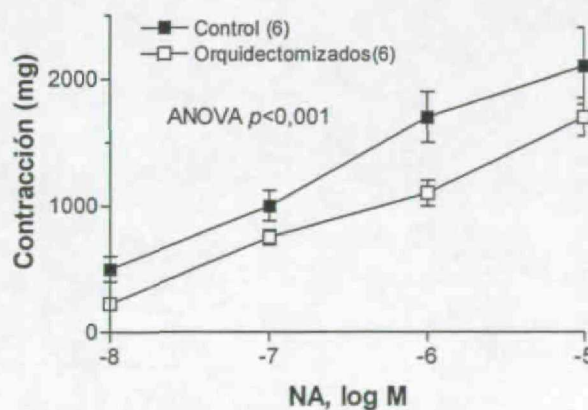


Figura 12: Efecto contráctil de la curva concentración-respuesta a NA en arteria mesentérica sin endotelio de animales control y orquidectomizados. Los resultados (Media \pm EEM) se expresaron en miligramos. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

Este resultado está de acuerdo con el descrito anteriormente para el KCl, en el que la respuesta contráctil también se veía disminuida, y con otros resultados previos en los que la castración de ratas macho diabéticas producía una disminución de la respuesta a NA en anillos de aorta (Cignarella y col, 2000), y no es descartable que se deba a una disminución en la sensibilidad al Ca^{2+} , aunque también puede ser debido a una modulación de la expresión de los receptores α -adrenérgicos.

El hecho de que la respuesta contráctil a EE sea igual en ambos grupos de animales, aunque la respuesta a NA es menor en machos orquidectomizados, podría sugerir que la liberación de NA fuese mayor en machos orquidectomizados. Estudios relacionados con este tema, llevados a cabo principalmente en sistema nervioso central, han encontrado resultados contradictorios, describiendo una disminución (Guan y Dluzen, 1991; Holmquist y col., 1994), un aumento (Siddiqui y Shah, 1997; Shang y Dluzen, 2002) y una no modificación (Agostini y col., 1981; Chen y col., 1999) en la liberación de NA en machos orquidectomizados. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito el posible papel de los andrógenos sobre la liberación de NA en el sistema nervioso periférico. Por tanto, el siguiente paso consistió en analizar el efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la liberación de NA. Observamos que la liberación inducida por EE era similar en ambos grupos de animales (control, $186,7 \pm 33,2$ cpm/mg; orquidectomizados, $196,4 \pm 26,94$; $p > 0,05$; $n=4$).

Estos datos nos hacen descartar nuestra hipótesis, y sugieren la posibilidad de que el EE podría inducir la liberación de agentes contráctiles deferentes a la NA en mayor medida en animales orquidectomizados.

Adicionalmente, la participación de otros neurotransmisores vasodilatadores en la respuesta inducida por EE no se puede descartar, por lo que se procederá a su análisis a continuación.

3. b Inervación sensitiva

Algunos autores han descrito la implicación del CGRP (Boeckxstaens y Pelckmans, 1997) en la respuesta a EE. Como se ha visto que las hormonas sexuales masculinas endógenas pueden modular la liberación de CGRP (Sun y col., 2001), en primer lugar se investigó la posible participación de dicho neurotransmisor en las respuestas contráctiles a EE en machos de ambos grupos, observando que la neurotoxina sensitiva, capsaicina (Li y Duckles, 1992; Ferdinandy y col., 1997) no modificó la respuesta vasomotora inducida por EE o por NA exógena en ambos grupos de animales (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto de 0,5 μ M de capsaicina o 5 nM de AMT sobre la contracción inducida por EE en arteria mesentérica de machos control v orquidectomizados.

Frecuencia (Hz)	Contracción (%)				
	1	2	4	8	16
<i>Control</i>	7,4 \pm 1,2	16,7 \pm 2,1	30,7 \pm 3	45 \pm 3	68 \pm 4,8
Capsaicina	10,9 \pm 1,9	22,4 \pm 2,3	37,4 \pm 3,4	44,6 \pm 2,6	64 \pm 5,3
AMT	7,4 \pm 2,2	19,3 \pm 2,6	35,8 \pm 3	47 \pm 2,5	59 \pm 6,3
<i>Orquidectomizados</i>	12 \pm 0,5	25,2 \pm 1,8	38,9 \pm 2	56 \pm 3,5	78,9 \pm 4,1
Capsaicina	10 \pm 2,5	21,3 \pm 2,3	39,5 \pm 3,2	55,6 \pm 3,9	74,3 \pm 6,3
AMT	14 \pm 0,3	22,4 \pm 1,6	38,6 \pm 1,4	51 \pm 5,2	75,3 \pm 8,1

Los resultados (Medias \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la contracción inducida por 75 mM KCl. n=5-7 animales.

Esto parece indicar que la inervación sensitiva no participa en la respuesta vasomotora debida a EE en nuestro modelo experimental. Previamente nuestro grupo de investigación ha podido observar el papel funcional de la inervación sensitiva sobre la respuesta vasomotora en el lecho mesentérico sólo en animales hipertensos (Marín y col., 2000), mientras que en distintas cepas de animales normotensos, como SD (Ferrer y col., 2000) y WKY (Marín y col., 2000) esta inervación no juega un papel

funcional. Adicionalmente, la ausencia de hormonas sexuales femeninas tampoco modifica la función de la inervación sensitiva en ratas hembra de la misma cepa (Minoves y col., 2002). Por tanto, estos resultados nos muestran que las hormonas sexuales masculinas no modifican la funcionalidad de la inervación sensitiva.

3. c Inervación nitrérgica

La participación del neurotransmisor vasodilatador NO, procedente de la inervación nitrérgica, puede participar sobre la respuesta a EE ha sido descrita previamente (Kawasaki y col., 1988, Marín y Balfagón, 1998). Para determinar si en nuestras condiciones experimentales el NO modula la respuesta a EE, se realizaron curvas de frecuencia-respuesta en ambos grupos de animales en presencia del inhibidor inespecífico de NOS L-NAME (10 μ M), pudiendo observarse que la contracción inducida por EE en presencia de dicho fármaco fue incrementada de forma significativa en ambos grupos de animales (Figura 13), aunque en mayor grado en animales orquitectomizados.

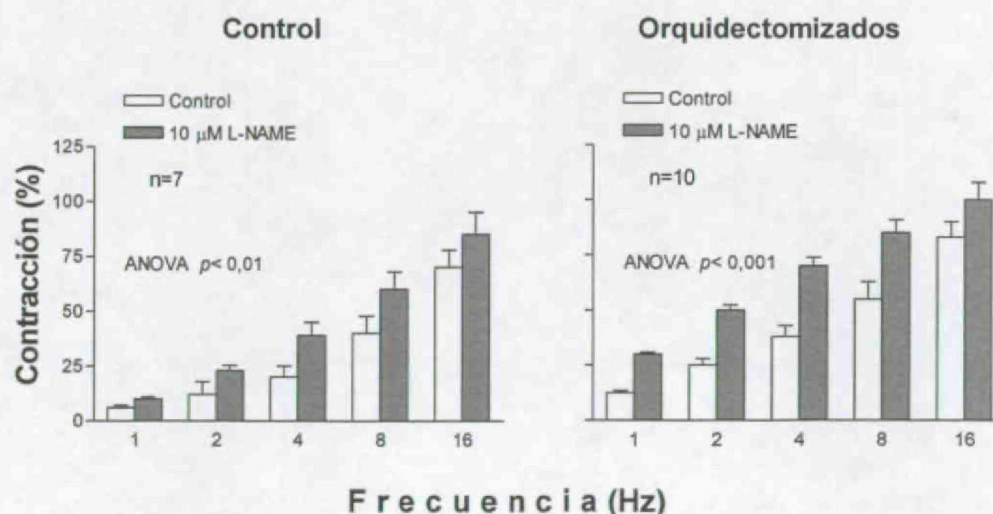


Figura 13: Efecto del L-NAME sobre las contracción inducida por EE en segmentos de arteria mesentérica de animales control y orquitectomizados. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como porcentaje del tono previo de 75 mM KCl (control, 1344 \pm 98; orquitectomizados, 1049 \pm 130 mg). n, número de animales.

El hecho de que el endotelio haya sido eliminado y que el AMT (5 nM), inhibidor selectivo de la iNOS (Tracey y col., 1995; Ferrer y col., 2000; Ishikawa y col., 2003), no modificara la respuesta vasomotora inducida por EE (Tabla 2) indica la implicación directa del NO de origen neuronal en la respuesta inducida por EE. Muestra, además, que la participación del NO neuronal es más pronunciada en machos orquidectomizados que en controles. Por tanto, los niveles de andrógenos inducen diferencias en la participación del NO de origen neuronal, ya sea por diferencias en su síntesis o en pasos posteriores a su liberación, en su ruta de transducción de señales que determinan su efecto vasomotor. Por eso analizaremos posteriormente cada uno de estos aspectos.

Expresión de nNOS

Los efectos descritos de los andrógenos sobre la liberación y función del NO vascular están centrados mayormente en el NO de origen endotelial, y a veces resultan contradictorios. La testosterona disminuye la relajación y acentúa a la disfunción endotelial en conejos macho (Hutchinson y col., 1997), aunque también se ha visto que la testosterona o sus derivados incrementan la actividad de eNOS (Weiner y col., 1994; Liu y Dillon, 2002) y de nNOS en el sistema nervioso central del cobaya (Weiner y col., 1994) y ratón (Scordalakes y col., 2002). Sin embargo, hasta lo que conocemos, no hay evidencias experimentales del efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la expresión de nNOS y la liberación de NO neuronal en tejidos vasculares. Por tanto, en primer lugar se analizó la expresión de nNOS, en homogenados de arteria mesentérica superior de rata, observándose una mayor expresión en segmentos de machos control que de orquidectomizados (Figura 14).

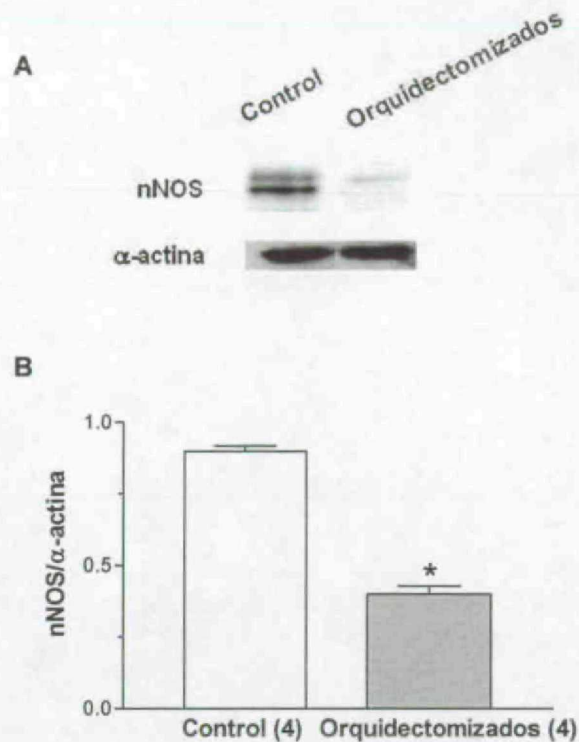


Figura 14: Western blot para la expresión de nNOS en segmentos de arteria mesentérica de machos control y orquidectomizados (A). La figura es representativa de preparaciones de cuatro animales distintos de cada grupo. El panel B muestra el análisis densitométrico de la expresión de nNOS. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para nNOS y la obtenida para la α -actina. * $p < 0,001$ frente a los controles.

Liberación de NO neuronal

Existen resultados contradictorios en cuanto a la regulación de la actividad de nNOS por las hormonas sexuales masculinas, ya que se han publicado datos en los que produjeron tanto un aumento (Weiner y col., 1994, Simoncini y col., 2003b) como una disminución (Singh y col., 2000; Reynoso y col., 2002) de dicha actividad. Por tanto, se procedió a cuantificar la liberación de NO a partir de nNOS en ambos grupos de ratas, midiendo la fluorescencia emitida por DAF-2. La incubación de arterias de ambos grupos produjo una emisión de fluorescencia basal similar, y el EE incrementó dicha fluorescencia también de forma similar en ambos grupos de ratas (Figura 14). La

preincubación con 10 μ M de L-NAME disminuyó la liberación de NO inducida por EE en arterias de ambos grupos (Figura 15).

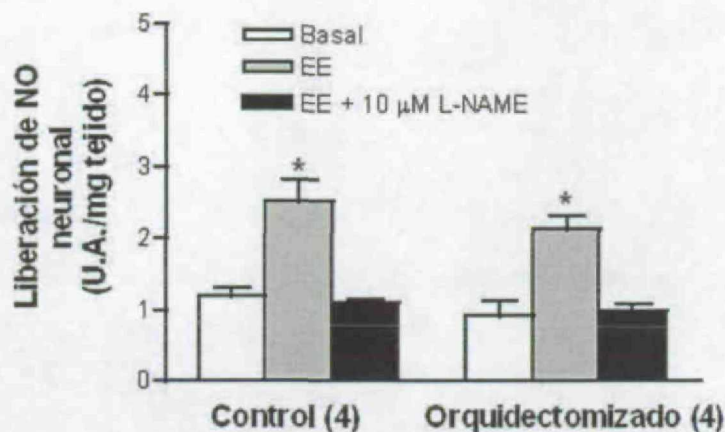


Figura 15: Efecto de la gonadectomía sobre la liberación de NO de origen neuronal basal y mediante estímulo eléctrico (EE; 1-16 Hz). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia arbitrarias (U.A.) frente a mg de tejido. * $p < 0,05$ frente a la liberación basal de NO.

Estos resultados ponen de manifiesto que, aunque la gonadectomía disminuye la expresión de nNOS, la liberación de NO de origen neuronal inducida por EE no se ve modificada, lo cual indica que se produce un incremento en la actividad de nNOS. Además, si tenemos en cuenta que el incremento en la respuesta a EE en presencia de L-NAME es mayor en arterias de machos orquidectomizados en comparación con los controles, estos resultados indican que las hormonas sexuales modifican un paso posterior a su liberación en la ruta de señalización del NO.

Participación de las hormonas sexuales masculinas sobre la ruta de señalización del NO/cGMP

Aunque la liberación de NO de origen neuronal fue igual en ambos grupos, los resultados expuestos anteriormente mostraban que la respuesta a EE en presencia de

L-NAME fue mayor en segmentos de machos orquitectomizados. Este resultado puede deberse a que las hormonas sexuales masculinas modulen la respuesta a NO en diversos puntos de su ruta de transducción de señales, como en la sensibilidad o en el metabolismo del NO.

Por lo tanto, el siguiente paso consistió en determinar posibles cambios en la sensibilidad del músculo liso vascular al NO liberado. Para ello se realizaron curvas a SNP, en arterias sin endotelio, obteniendo que en segmentos de arteria mesentérica precontraídos con 1 μ M de NA, el SNP indujo una relajación dependiente de concentración más pronunciada en machos orquitectomizados que en controles (Figura 16).

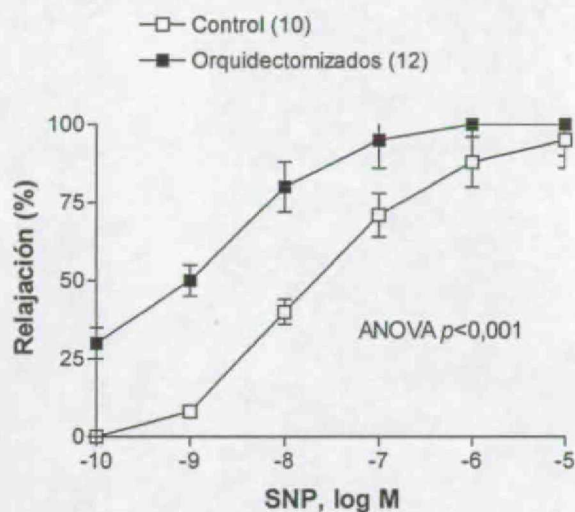


Figura 16: Efecto vasodilatador de SNP en arteria mesentérica de ratas macho control y orquitectomizadas. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por 1 μ M de NA (control, 1344 ± 98 ; orquitectomizados, 1049 ± 130 mg). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

Estos resultados sugieren un posible aumento en la sensibilidad al NO en machos orquitectomizados, y contrastan con otros resultados anteriores, en los que se describe que un tratamiento agudo *in vitro* con testosterona favorece la relajación inducida por SNP en arteria coronaria de cerdo (Quan y col., 1999; Teoh y col., 2000a), y con resultados obtenidos en aorta de rata, en los que la castración no

modificó la respuesta inducida por SNP (Ferrer y col., 1999). Esta discrepancia puede ser explicada a que, a pesar de utilizar la misma cepa de animales y el método de castración es el mismo, estamos estudiando un lecho vascular distinto.

Hemos de recordar que el NO induce la formación de cGMP a través de la activación de la GC (Traylor y Sharma, 1992; Stone y Marletta, 1994; Stone y col., 1995), que produce vasodilatación mediante diversos mecanismos. Por lo tanto, el siguiente paso consistió en ver si la sensibilidad al cGMP se veía modificada por la gonadectomía. Para determinar este factor, se realizaron curvas al análogo no hidrolizable de cGMP, 8-Br-cGMP (0,1 μ M-0,1 mM), obteniendo que la respuesta vasodilatadora no fue estadísticamente distinta en segmentos de ambos grupos (Figura 17).

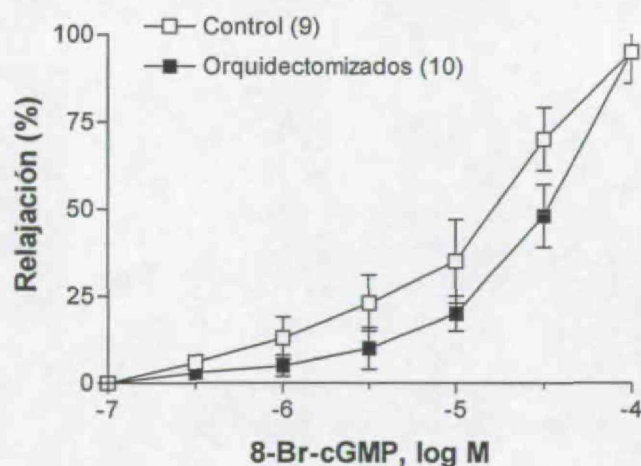


Figura 17: Efecto vasodilatador de 8-Br-cGMP en arteria mesentérica de ratas macho control y orquidectomizadas. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por 1 μ M de NA (control, 1344 ± 98 ; orquidectomizados, 1049 ± 130 mg). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

Este resultado sugiere que la formación de cGMP podría estar incrementada en machos orquidectomizados. Por tanto, se analizó la activación de la guanilato ciclasa midiendo la formación de cGMP basal y la estimulada por 0,1 μ M de SNP durante 10 s. Los resultados obtenidos muestran que tanto los niveles basales de cGMP como los inducidos por SNP fueron similares en segmentos de ambos grupos (Figura 18).

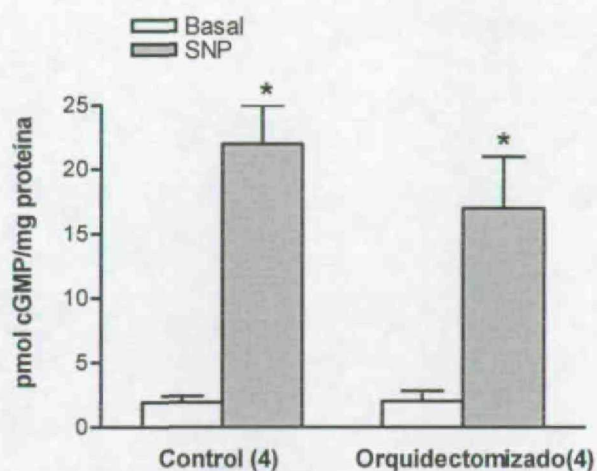


Figura 18: Efecto de la gonadectomía sobre la liberación de cGMP basal y estimulado con 0,1 μ M de SNP. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como pmol cGMP /mg de proteína insoluble * $p < 0,05$ frente a la liberación basal de cGMP.

Estos resultados concuerdan con datos descritos anteriormente, en los que las hormonas esteroideas no modifican la formación de cGMP basal en cultivos células renales de rata (Kanda y col., 1989). Sin embargo, discrepan con otros estudios en los que se ha visto un aumento de cGMP en próstata de rata tras la castración (Hayek y col., 1999). También existen estudios que han demostrado un aumento en los niveles de cGMP en conejos hembra ooforectomizados tratados con DHEA en comparación con los animales sin tratar (Hayashi y col., 2000). Esta discrepancia pone de acuerdo, una vez más, que los tratamientos y los modelos experimentales son determinantes a la hora de obtener los resultados, y que variaciones en ellos pueden poner en marcha

mecanismos celulares que modifiquen la formación o la función de la sustancia a examinar.

Los datos hasta aquí mostrados sugieren que el efecto vasodilatador más pronunciado obtenido en machos orquidectomizados debido al SNP, e indirectamente al NO neuronal no se debe a diferencias en los niveles formados de cGMP, ni al efecto vascular inducido por dicho nucleótido. Hemos de tener en cuenta además que en nuestras condiciones experimentales, los productos derivados del NO, como las especies reactivas de oxígeno, pueden activar, entera o parcialmente, la guanilato ciclasa (Sato y col., 2003; Li y col., 2004a). Teniendo en cuenta que recientemente se ha descrito un papel antioxidante de los andrógenos (Békési y col., 2000; Yorek y col., 2002), no se debe descartar la posible implicación de las especies reactivas de oxígeno en las respuestas vasculares, puesto que pueden alterar el metabolismo del NO (Beckman y Koppenol, 1996; Hink y col., 2003) y, por tanto, las respuestas vasomotoras a EE y SNP. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que se producen factores vasodilatadores distintos al NO en arterias de machos orquidectomizados, lo cual podría explicar el mayor efecto del SNP y el NO de origen neuronal en estos animales.

Participación de especies reactivas de oxígeno en la respuesta a NO

Aniones superóxido

Entre todas las especies reactivas de oxígeno, los aniones superóxido desempeñan un papel crítico, puesto que son la fuente de otros intermediarios reactivos de oxígeno (Li y col., 1997; Touyz, 2002). Por lo tanto, en primer lugar se estudió si existían diferencias en la formación de aniones superóxido midiendo la quimioluminiscencia producida por la lucigenina, observando que la quimioluminiscencia eliminada por el

tiron fue mayor en segmentos de machos orquidectomizados que en machos control (Figura 19).

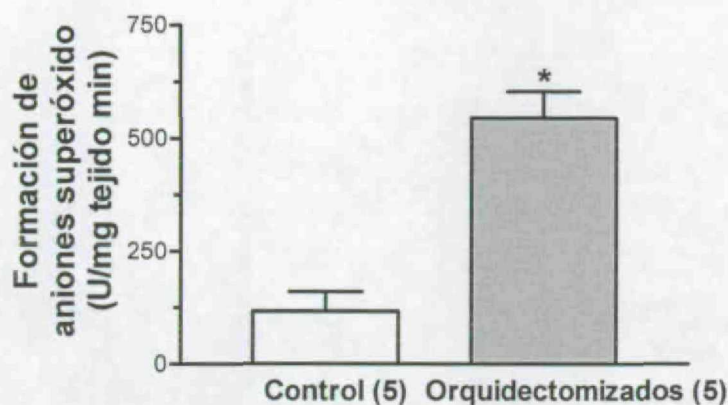


Figura 19: Formación de aniones superóxido en machos control y orquidectomizados. Los resultados se expresaron como unidades de quimioluminiscencia (U)/minuto mg tejido. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. * $p < 0,001$ frente al control.

El siguiente paso fue estudiar la posible implicación funcional de los aniones superóxido en arterias de ambos grupos de animales, analizando el efecto que desempeña el secuestrador de aniones superóxido, SOD, sobre la relajación inducida por SNP. En segmentos precontraídos con NA de machos controles, la preincubación con 13 U/ml de SOD no modificó la respuesta inducida por el SNP (Figura 20). Por el contrario, en segmentos de machos orquidectomizados, SOD incrementó la vasorrelajación inducida por SNP (Figura 20).

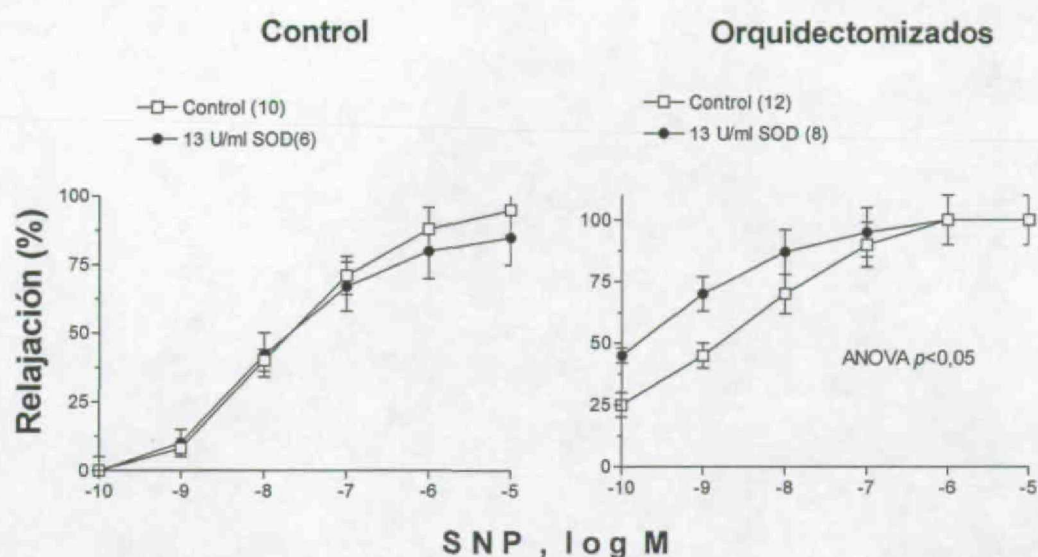


Figura 20: Efecto de la superóxido dismutasa (SOD) sobre las curvas concentración-respuesta a SNP en segmentos precontraídos con NA de machos control y orquidectomizados. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como inhibición de la contracción producida por 1 μ M de NA (control, 1475 ± 195 ; orquidectomizados, 1083 ± 104 mg). El número de animales se indicó entre paréntesis.

Este resultado parece indicar que la eliminación de las hormonas sexuales lleva a un incremento en la generación de aniones superóxido, que metaboliza el NO, reduciendo así su efecto vascular. Sin embargo, no se puede descartar la participación de otras especies reactivas de oxígeno derivadas de los aniones superóxido en este efecto.

Peroxinitritos

Se sabe que la interacción entre el NO y los aniones superóxido lleva a la formación de peroxinitrito, que posee un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo oxidación de biomoléculas y nitrosilación de tirosinas de distintas proteínas (Beckman y Koppenol, 1996; Hink y col., 2003), aunque también se ha propuesto un efecto vasodilatador del peroxinitrito (Beckman y Koppenol, 1996; Li y col., 2004b). Por tanto, primeramente se determinó si existían diferencias en la formación de peroxinitritos en ausencia de hormonas sexuales masculinas utilizando la valoración de la

dihidrorodamina-123 oxidada. En situación basal, no se detectó oxidación de dihidrorodamina ni en presencia ni en ausencia de hormonas sexuales masculinas, lo cual indica que el método no es lo suficientemente sensible para valorar peroxinitritos en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, en presencia del donador de NO, SNP (0,1 μ M), sí se detectó oxidación de la dihidrorodamina, observándose que fue mayor en segmentos de machos orquidectomizados (Figura 21). Estos resultados concuerdan con resultados obtenidos previamente mediante localización inmunohistoquímica de nitrotirosina, marcador de la formación de peroxinitritos (Beckman y Koppenol, 1996), en los que se vio un gran aumento en arterias de machos orquidectomizados (Martín y col., 2005).

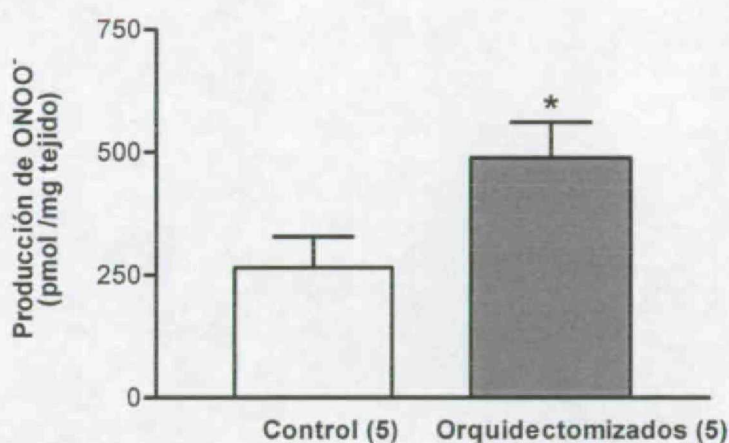


Figura 21: Formación de peroxinitritos en machos control y orquidectomizados. Los resultados se expresaron como pmol de peroxinitrito/mg tejido. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. * $p < 0,05$ frente al control.

Como hemos explicado previamente, adicionalmente a sus efectos deletéreos se ha propuesto el efecto vasodilatador del peroxinitrito (Beckman y Koppenol, 1996; Li y col., 2004). Por lo tanto, el siguiente paso en nuestro estudio consistió en comprobar el posible efecto vasodilatador en arterias de ambos grupos precontraídas con NA (Figura 22), observando que el peroxinitrito produce un efecto vasodilatador similar en ambos grupos.

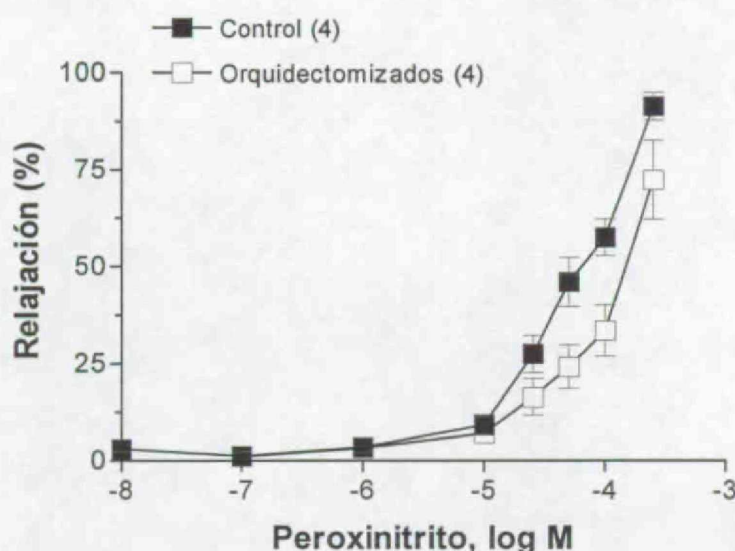


Figura 22: Respuesta a peroxinitrito exógeno en segmentos precontraídos con NA de machos control y orquidectomizados. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por 1 μ M de NA. (control, 1360 ± 215 ; orquidectomizados, 1079 ± 94 mg). El número de animales se indica entre paréntesis.

Este resultado, junto con la mayor producción de peroxinitritos en animales orquidectomizados, podría explicar el incremento de la relajación a SNP en animales orquidectomizados.

Ahora bien, si la producción incrementada de peroxinitritos en animales orquidectomizados es la responsable de la mayor relajación a SNP en animales orquidectomizados, ¿por qué la incubación con SOD, que al eliminar los aniones superóxido disminuye la formación de peroxinitritos, produce un aumento en la

respuesta a SNP? Para explicar este punto, es importante remarcar que la presencia de SOD exógena disminuye la formación de peroxinitrito eliminando los aniones superóxido, y, a su vez, aumenta la formación de H_2O_2 (Rubanyi y Vanhoutte, 1986a; Wei y col., 1996), para la que se ha descrito un efecto vasodilatador. Por lo tanto, se puede hipotetizar que el aumento en la relajación a SNP en presencia de SOD puede deberse a la generación de H_2O_2 .

Para comprobarlo, en primer lugar se analizó el posible efecto vasodilatador del H_2O_2 en nuestra preparación, realizándose curvas concentración-respuesta a H_2O_2 ($10 \mu M$ -1 mM) en arterias de ambos grupos de animales precontraídas con NA, observándose una relajación similar en ambos grupos (Figura 23).

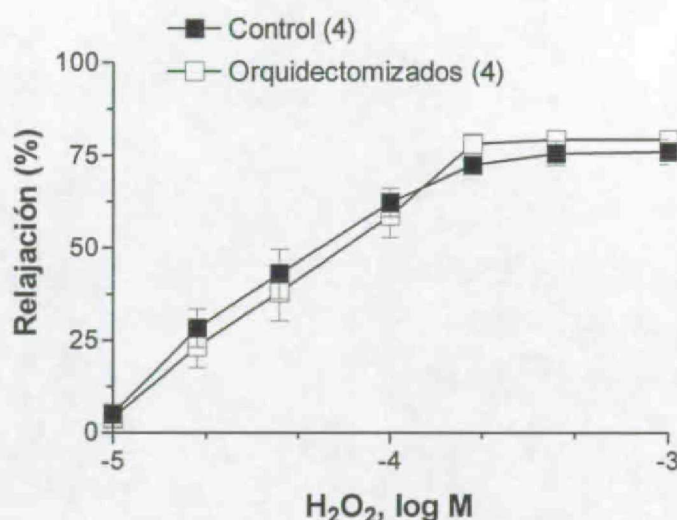


Figura 23: Respuesta a H_2O_2 en segmentos precontraídos con NA de machos control y orquidectomizados. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por $1 \mu M$ de NA (control, 1415 ± 122 ; orquidectomizados, 1135 ± 105 mg). El número de animales se indica entre paréntesis.

Posteriormente, se comprobó si el aumento en la relajación a SNP en presencia de SOD se debía a la formación de H_2O_2 . Para ello, se realizaron también curvas de SNP en presencia simultánea de SOD y catalasa (1000 U/mL), observando una reversión

en el efecto de la SOD sobre la respuesta a SNP (Figura 24). Esto indica que el H_2O_2 sintetizada en presencia de SOD posee un efecto vasodilatador.

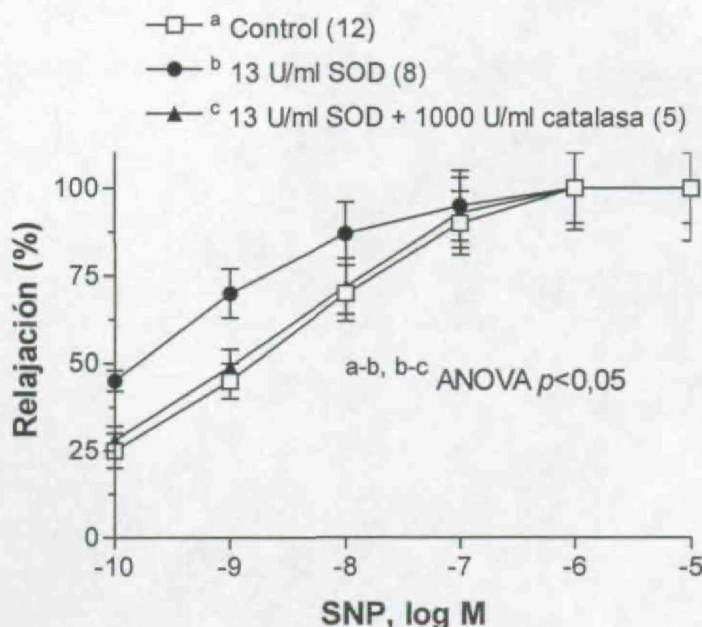


Figura 24: Efecto de la superóxido dismutasa (SOD) y la SOD con catalasa sobre las curvas concentración-respuesta a SNP en segmentos precontraídos con NA de machos orquidectomizados. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como inhibición de la contracción producida por $1 \mu M$ de NA 1083 ± 104 mg). El número de animales se indicó entre paréntesis..

Estos resultados, en su conjunto, indican que los productos derivados del metabolismo del NO, principalmente peroxinitrito y H_2O_2 , contribuyen a la relajación inducida por el SNP. Además, el hecho de que el efecto del L-NAME sea mayor en arterias de machos orquidectomizados demuestra la implicación de productos derivados del metabolismo del NO neuronal en estos animales, puesto que la inhibición de la síntesis de NO previene la formación de dichos productos derivados del NO, que median el efecto vasodilatador, y por eso la contracción a EE es mayor.

Nuestros resultados también han puesto de manifiesto que la privación de hormonas sexuales masculinas disminuyen la expresión de la nNOS, sin modificar la

liberación de NO, lo que indica que la actividad de la nNOS está aumentada en arterias de ratas orquitectomizadas.

Por otra parte, se ha descrito que los $O_2^{\cdot -}$ y los $ONOO^{\cdot -}$ pueden actuar sobre distintas vías celulares de señalización, aumentando la actividad de PKC (Oeckler y Wolin, 2000; Bapat y col., 2001; Balafanova y col., 2002), que a su vez puede inducir cambios adaptativos en la función vascular. Uno de estos cambios parece consistir en el aumento de la actividad de la nNOS por la PKC (Nakane y col., 1991; Okada, 1992; Okada, 1995). Por lo tanto, nosotros hipotetizamos que la actividad de PKC podría verse aumentada en arterias de machos orquitectomizados, y que puede ser responsable del aumento en la actividad de la nNOS.

4. Efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la actividad PKC

PKC es una familia de Ser-Thr quinasas que son críticas en la transducción de señales en un amplio rango de procesos esenciales:

- Presenta gran importancia en numerosas situaciones patológicas, como desarrollo de diabetes (Ferrer y col., 2000) y de tumores (Nishizuka, 1984, Shen, 2003). Es por eso por lo que se han utilizado distintos inhibidores de PKC para combatir dichas patologías. Por ejemplo, la administración oral de inhibidores selectivos de la isoforma β de PKC redujo la disfunción endotelial inducida por hiperglicemia en pacientes sanos (Beckman y col., 2002). Asimismo, se han utilizado distintos inhibidores de PKC en las primeras fases de diversos ensayos clínicos en pacientes con tumores, obteniéndose distintas respuestas en función del tumor a tratar, el inhibidor utilizado y la administración del tratamiento (Sausville y col., 2001; Thavasu y col., 1999; Virchis y col., 2002; Li y col., 1999).

- Es muy importante en la iniciación de las respuestas inmunes, el control del crecimiento y proliferación celular, y en el control del tono vascular.
- De forma más específica, en lo que respecta al tono vascular, interviene en la contracción del músculo liso (Okon y col., 2003; Salamanca y Khalil, 2005), por intervención en la respuesta a distintos factores vasomotores (Carter y Kanagy, 2003; Wang y col., 2004; Zhang y col., 2004; Ding y Murray, 2005), pudiendo ejercer su acción a través de efectos regulando la actividad de canales iónicos, proteínas del citoesqueleto y de adhesión celular como actina e integrina, factores de transcripción como NF κ B, y otras quinasas como IKK y PKD (Spitaler y Candrell, 2004; Ward y col., 2004).

A pesar de la importancia de PKC en el control del tono vascular, son muy escasos los estudios relacionándola con las hormonas sexuales endógenas en tejido vascular. En estudios realizados en aorta de machos y hembras WKY y SHR (Kanashiro y Khalil, 2001) se podía ver que no existían diferencias en la actividad de PKC en machos orquidectomizados, y que aumentaba en hembras ovariectomizadas. Sin embargo, en este estudio no se analizó la posible repercusión de estas variaciones sobre la función vascular. Por tanto se investigó si las hormonas sexuales masculinas endógenas inducían diferencias en la actividad de PKC, observándose que la actividad PKC fue mayor en arterias mesentéricas de machos orquidectomizados en comparación con los controles (Figura 25).

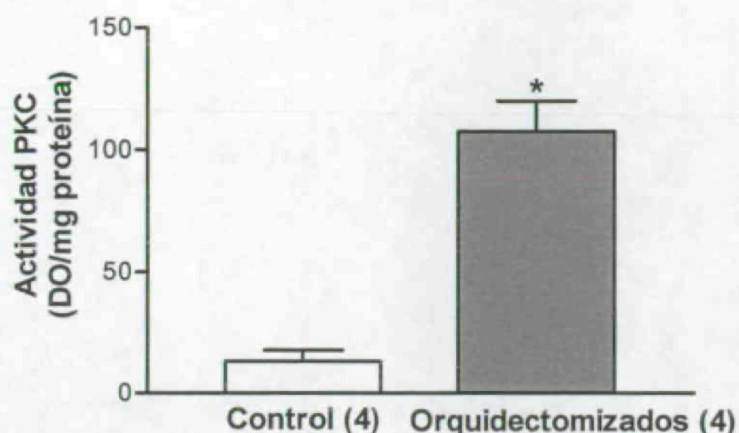


Figura 25: Efecto de la gonadectomía sobre la actividad PKC en segmentos de arteria mesentérica de ambos grupos de ratas. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como unidades de densidad óptica (DO) /mg proteína insoluble. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. * $p < 0,01$ frente a arterias de animales control.

Estos resultados son contradictorios con lo publicado anteriormente en aorta de rata Wistar-Kyoto (Kanashiro y Khalil, 2001), donde no se encontraban diferencias. Esta discrepancia puede ser debida a una diferencia en la edad de la rata, el tipo de gonadectomía, la edad en la que se realizó la cirugía, el lecho vascular, y la cepa del animal. Además, nuestros resultados no son totalmente sorprendentes, puesto que, como se ha comentado anteriormente, se ha descrito que la actividad PKC se puede ver modificada por un aumento en los niveles de aniones superóxido y peroxinitritos (Oeckler y Wolin, 2000; Bapat y col., 2001; Balafanova y col., 2002), compuestos cuya formación basal aumenta en nuestras condiciones experimentales de privación de hormonas sexuales masculinas (Martín y col., 2005).

5. Acción de la PKC sobre la liberación y función de NO de origen neuronal

Los datos anteriormente expuestos muestran una menor expresión de nNOS en arterias de machos orquidectomizados, mientras que la liberación de NO es igual en ambas situaciones experimentales (Martín y col., 2005), lo cual indica una mayor actividad de nNOS en arterias de machos orquidectomizados. Se sabe, además, que la actividad nNOS puede ser regulada tanto positiva (Nakane y col., 1991; Okada, 1992; Okada, 1995) como negativamente (Onoue y col., 2002) por PKC. Como hemos podido observar que la actividad de PKC es mayor en arterias de machos orquidectomizados, podemos lanzar la hipótesis de que la actividad nNOS se puede ver aumentada por PKC. Por tanto, el siguiente paso consistió en analizar si en esta supuesta mayor actividad de nNOS en machos orquidectomizados está implicada la PKC, para lo cual se procedió a medir la liberación de NO en presencia de un activador inespecífico de la PKC y de diversos inhibidores de la PKC.

La preincubación de las arterias con 1 nM del activador de la PKC PDBu (Nishizuka, 1984; Abdel-Latif y col., 1986; Ferrer y col., 1992) aumentó la liberación de NO producida por EE en arterias de ambos grupos, pero en mayor medida en machos orquidectomizados (Figura 26). La preincubación con 0,1 μ M del inhibidor de PKC calfofina C abolió la liberación de NO producida por EE en machos controles, y la disminuyó en machos orquidectomizados (Figura 26). Estos resultados indican que la PKC está implicada en la activación de nNOS en arterias de ambos grupos de animales. Como el grado de activación de PKC es mayor en arterias de machos orquidectomizados que en machos controles, tanto PDBu como calfofina C mostraron menor capacidad de aumento o disminución, respectivamente, en la liberación de NO en arterias de machos orquidectomizados en comparación con machos controles.

Al utilizar un mimético farmacológico del diacilglicerol, el PDBu, hemos estimulado las isoformas convencionales y nóveles (Ward y col., 2004). Además se utilizó el inhibidor inespecífico de PKC calfofistina C (Kobayashi y col., 1989; Ferrer y col., 2000). Aunque no existen inhibidores selectivos para las distintas isoformas de PKC (Davies y col., 2000), ciertos compuestos, como el indocarbazol Gö6976, son parcialmente selectivos sobre las isoformas convencionales frente a las nóveles o las atípicas. Asimismo, se ha descrito que la isoforma atípica PKC ζ es un modulador de la respuesta vascular a distintos agentes (Damron y col., 1998; De Witt y col., 2001; Cogolludo y col., 2003). Por tanto, se ha investigado la posible participación de ambas isoformas sobre la liberación de NO de origen neuronal.

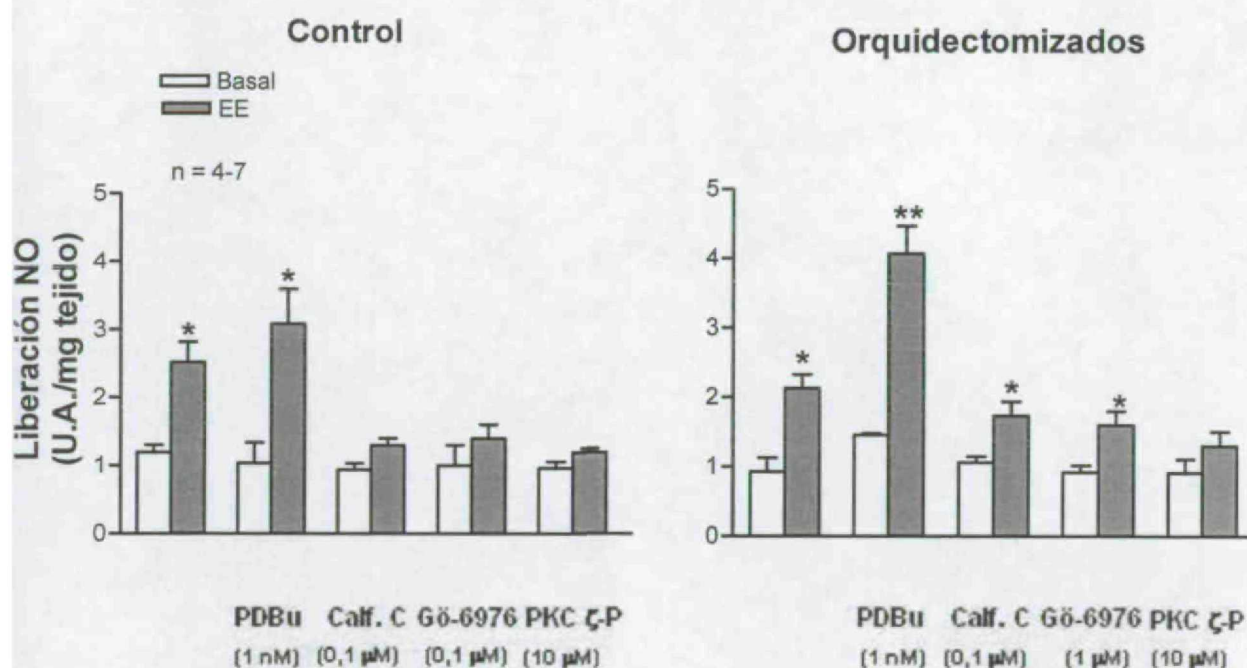


Figura 26: Efecto del PDBu (1 nM), calfofistina C (0.1 μM), Gö6976 (0.1-1 μM) y PKC- ζ PI (10 μM) sobre la liberación de NO basal e inducida por EE en segmentos de arteria mesentérica sin endotelio de ambos grupos de animales. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (UA)/ mg tejido. n = Número de animales. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente a la liberación basal de NO correspondiente.

La preincubación con 0,1 μM de Gö6976 abolió la liberación de NO producida por EE en machos controles, pero no la modificó en machos orquidectomizados, en los cuales fue necesario incrementar la concentración a 1 μM de Gö6976 para obtener una disminución de la liberación de NO (Figura 25). La preincubación con 10 μM de PKC ζ -PI disminuyó la liberación de NO producida por EE en ambos grupos de animales por igual (Figura 26).

Todos estos resultados apoyan la teoría de que la nNOS parece estar mucho más activada por PKC en ausencia de hormonas sexuales masculinas endógenas. Esta mayor activación se debe probablemente a una mayor actividad de las isoformas convencionales de PKC. Además, en la regulación de la liberación de NO neuronal también participa la isoforma PKC ζ de manera similar en ambos grupos de animales.

El siguiente objetivo fue estudiar cómo influye la PKC en la función del NO neuronal. Para analizar este punto, se ensayó el efecto de la activación e inhibición de PKC sobre la respuesta vasomotora producida por EE.

Para confirmar la participación de PKC en la respuesta vasomotora producida por EE, esta enzima se activó con PDBu, que redujo la respuesta a EE en segmentos de animales control, mientras que no la alteró en arterias de animales orquidectomizados (Figura 27).

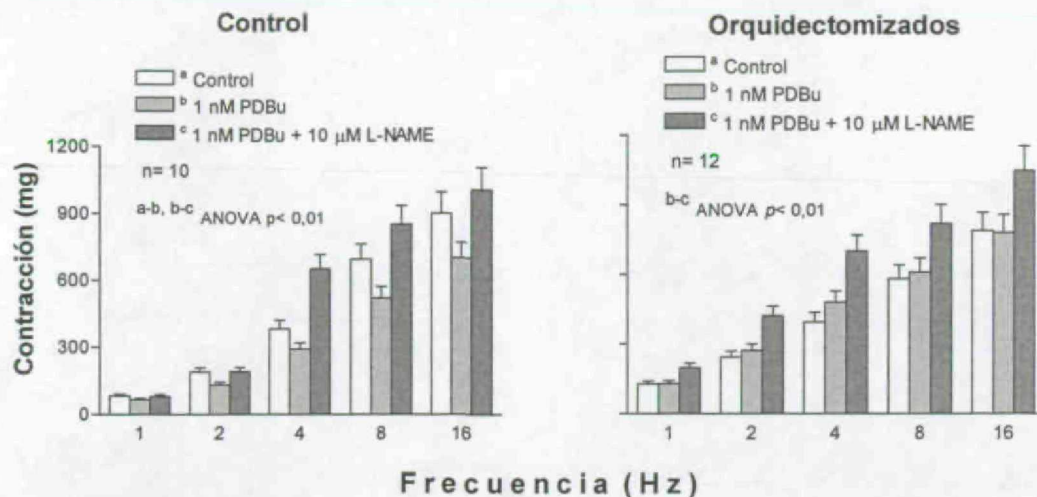


Figura 27: Efecto del PDBu (0,1 µM) y PDBu con L-NAME (10 µM) sobre la respuesta a EE en arteria mesentérica de machos control y orquitectomizados. Los resultados se expresaron como media \pm EEM.

La presencia de 1 nM de PDBu junto con L-NAME incrementó la respuesta a EE en ambos grupos de ratas. Además, la respuesta producida por NA en arterias de animales controles no fue modificada por 1 nM de PDBu, pero aumentó en animales orquitectomizados (Figura 28). Los fármacos utilizados no alteraron el tono basal en segmentos de ambos grupos.

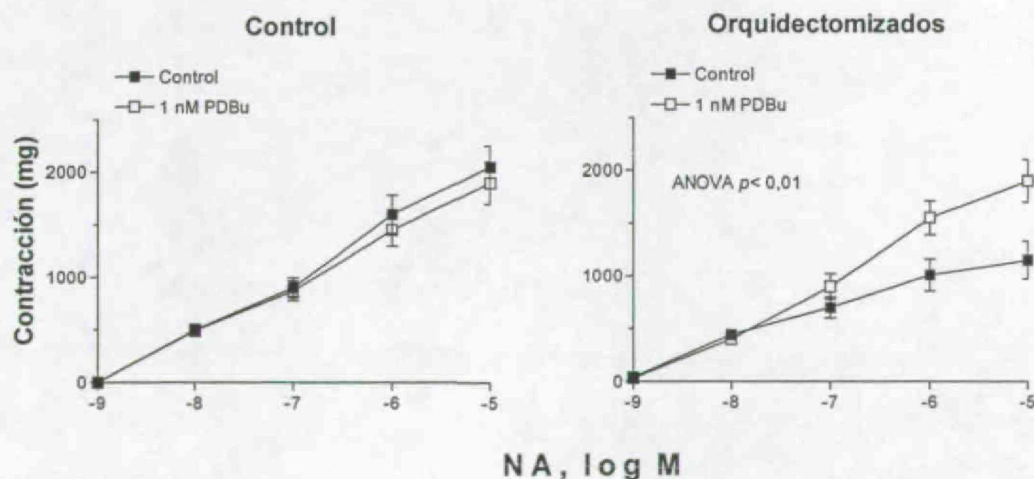


Figura 28: Efecto del PDBu (1 nM) sobre las curvas concentración-respuesta a NA en arteria mesentérica de machos control y orquitectomizados. Los resultados se expresaron en mg (media \pm EEM). n = 5-8.

Estos resultados indican que la activación de PKC en arterias de animales control disminuye la respuesta vasoconstrictora a EE aumentando la formación de NO, tal y como se ha visto en los experimentos de liberación de NO. Sin embargo, en segmentos de machos orquidectomizados el PDBu incrementa la respuesta a NA exógena; este resultado justifica que el PDBu no disminuya la contracción a EE en arterias de animales orquidectomizados, a pesar de que existe un aumento mayor de NO que en animales control.

La presencia de 0,1 μ M de calfofistina C incrementó la respuesta contráctil a EE en arterias de ambos grupos de animales. La presencia de calfofistina C junto con L-NAME no modificó la respuesta vasoconstrictora producida por EE en presencia de calfofistina C en machos control, pero aumentó la respuesta observada en animales orquidectomizados. (Figura 29).

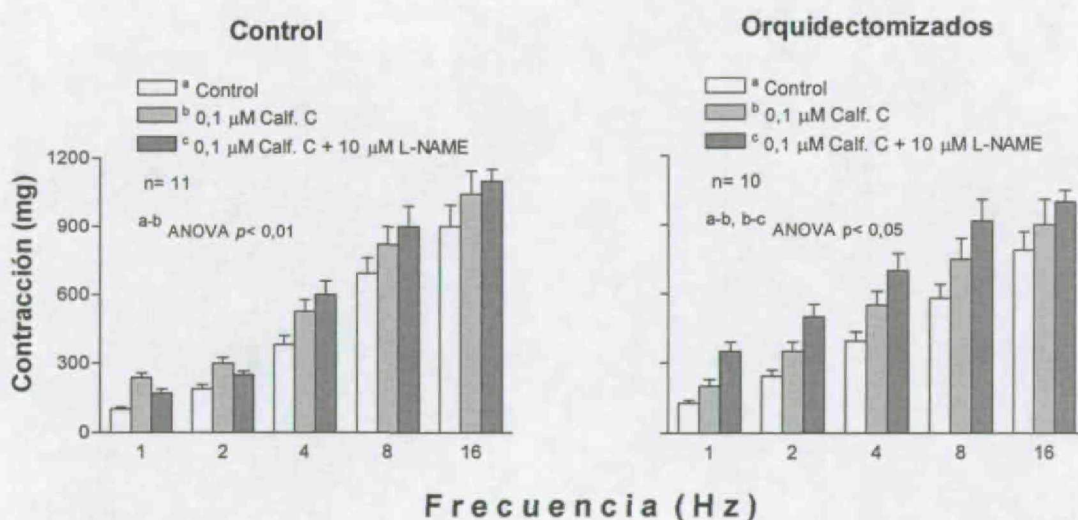


Figura 29: Efecto de la calfofistina C (0,1 μ M) y calfofistina C con L-NAME (10 μ M) sobre la respuesta a EE en arteria mesentérica de machos control y orquidectomizados. Los resultados se expresaron como media \pm EEM.

A su vez, la respuesta a NA no se vio modificada en ninguno de los dos casos (Figura 30).

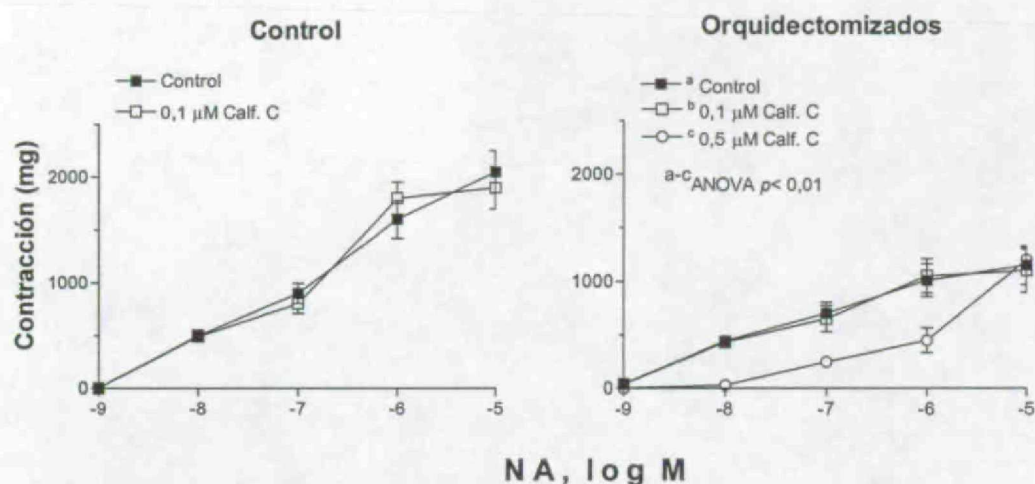


Figura 30: Efecto de la Calfofistina C (0,1 μ M - 0,5 μ M) sobre las curvas concentración-respuesta a NA en arteria mesentérica de machos control y orquidectomizados. Los resultados se expresaron en mg (media \pm EEM). $n = 5-8$.

Esto indica que en machos controles, cuando la PKC está inhibida por calfofistina C no se observa el efecto potenciador del L-NAME, lo cual implica que la producción de NO se ve inhibida completamente por la calfofistina C. Por otra parte, los resultados en machos orquidectomizados indican que la inhibición de PKC por calfofistina C reduce la formación de NO, pero no la eliminan por completo como ocurre con los machos controles.

Este efecto puede deberse a que la actividad de PKC es mayor en machos orquidectomizados y, por tanto, no es inhibida completamente, al igual que en los experimentos de liberación de NO. Por tanto, se utilizó en machos orquidectomizados una concentración de calfofistina C mayor (0,5 μ M), la cual indujo una disminución notable en la respuesta a NA exógena (Figura 30) a diferencia de la concentración de 0,1 μ M de calfofistina C, pero no modificó la respuesta a EE (Figura 31).

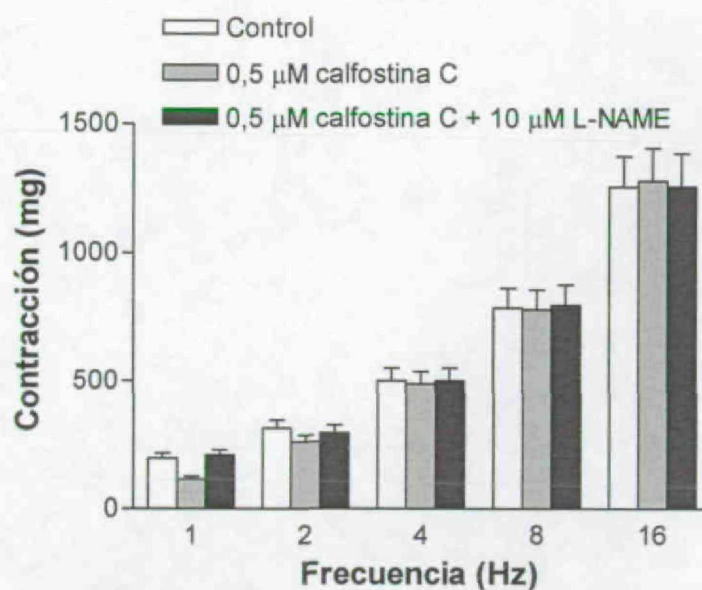


Figura 31: Efecto de calfofistina C (0,5 μM) y calfofistina C con L-NAME (10 μM) sobre la respuesta a EE en arteria mesentérica de machos orquidectomizados (n = 4). Los resultados se expresaron como media ± EEM.

Puesto que la respuesta vasoconstrictora neta inducida por EE es el resultado del balance de neurotransmisores vasoconstrictores y vasodilatadores, el hecho de que la gonadectomía no alterara la respuesta a EE en presencia de calfofistina C, a pesar de que la disminución en la respuesta a NA indicaría una pérdida en liberación de NO. Esta posibilidad se ve apoyada por el hecho de que la adición de L-NAME no modificó la respuesta a EFS que se obtuvo en presencia de la concentración más alta de calfofistina C utilizada.

Por tanto, en lo que concierne al efecto del PDBu y la calfofistina C sobre la respuesta vasomotora inducida por EE, están de acuerdo con el incremento observado en la actividad de PKC, y refuerzan la hipótesis de que nNOS estuviese más activada por PKC en arterias de machos orquidectomizados.

Como se ha explicado anteriormente, la PKC está implicada en diversas vías de señalización, varias de las cuales pueden modificar los efectos del NO, como la

alteración de canales de K^+ (Wang y col., 2004; Cogolludo y col., 2005; Tsukamoto y col., 2005) o de Ca^{2+} (Hayashi y col., 2005). Por lo tanto, el siguiente factor a estudiar fue si la PKC estaba implicada en la sensibilidad a NO en nuestro modelo experimental, realizando curvas al donante de NO, SNP. Se pudo observar que la respuesta a SNP (0,1 nM-10 μ M) no se vio modificada por 0,1 μ M de calfofostina C, o 1 nM de PDBu en arterias de machos control (Figura 31); sin embargo, en arterias de machos orquidectomizados la respuesta a SNP no fue modificada en presencia de 0,1 μ M de calfofostina C, pero se vio aumentada en presencia de 1 nM de PDBu (Figura 32).

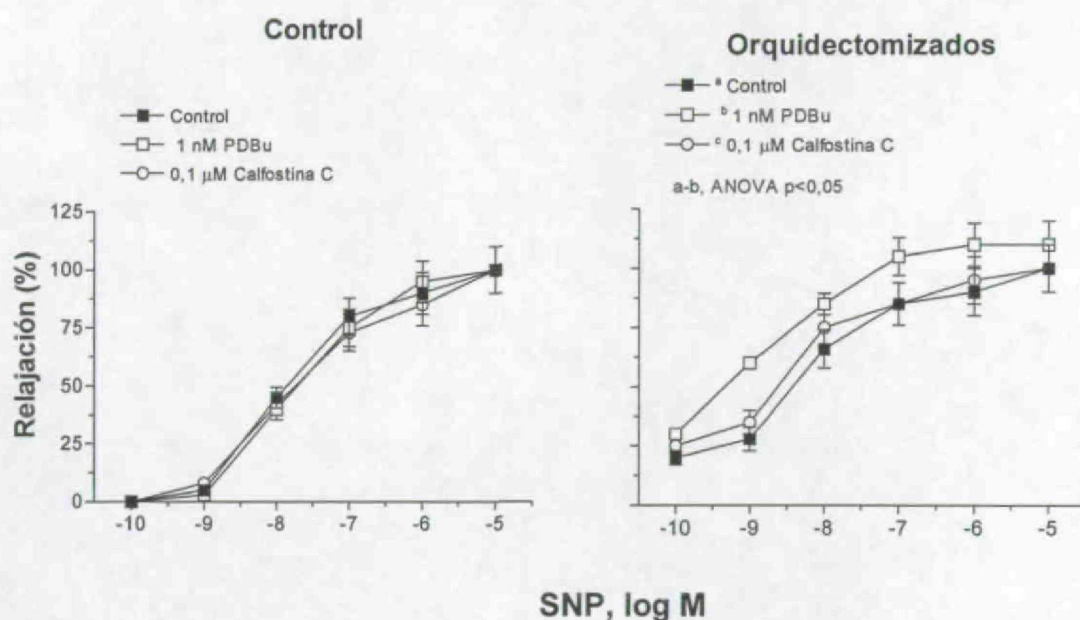


Figura 32: Efecto de PDBu (1 nM) y calfofostina C (0,1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a SNP EE en arteria mesentérica de ratas macho control y orquidectomizados. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como porcentaje del tono previo de NA. n= 5-8

Aunque se ha descrito previamente que la activación de la PKC disminuye la respuesta a SNP (Pérez-Vizcaino y col., 1997), estudios más recientes han demostrado que la activación de PKC también puede incrementar la actividad de los canales de potasio (Aizawa y col., 2004; Barman y col., 2004), lo que a su vez incrementaría la respuesta a SNP. Sea cual sea el mecanismo mediante el cual el

PDBu incrementa las respuestas a NA y a SNP, la importancia radica en que ambas acciones opuestas, vasoconstricción y vasodilatación, pueden explicar que no exista una modificación en la respuesta vasoconstrictora neta producida por EE en presencia de PDBu.

Es importante señalar que la PKC parece ser la responsable del incremento en la actividad de nNOS en arterias de machos orquidectomizados, y que, a pesar de la disminución en la expresión de nNOS que se produce debido a la gonadectomía, este incremento en la actividad de nNOS mantiene los niveles de NO de origen neuronal similares a los de machos control, y podría compensar la pérdida de biodisponibilidad de NO que se observa en esta situación.

6. Participación del NO endotelial en la respuesta inducida por ACh

Se ha comentado en la introducción el importante papel del NO endotelial en la regulación del tono vascular (Sánchez-Ferrer y Marín, 1990; Vanhoutte, 1996), y se han descrito diferencias en la liberación y función del NO endotelial dependientes de género, habiéndose estudiado más extensamente el efecto de las hormonas sexuales femeninas que de las masculinas. Se han descrito principalmente efectos protectores de los estrógenos dependientes del endotelio (Bolego y col., 1999; Cignarella y col., 2000; Conde y col., 2000; Massheimer y col., 2002; Minoves y col., 2002), pero en lo que respecta a los andrógenos, estos estudios son más escasos y contradictorios, habiéndose descrito tanto una mejora como una disminución de la función endotelial (Cignarella y col., 2000; Ferrer y col., 1999). La mayoría de los estudios analizando el efecto de los andrógenos sobre el NO endotelial se han centrado en el análisis de aspectos aislados de los componentes de este sistema. Así, se ha descrito que los andrógenos pueden aumentar (Simoncini y col., 2003b), disminuir (Chatrath y col.,

2003) o no modificar (McNeill y col., 1999) la expresión de eNOS. En lo que respecta a la actividad de eNOS, se ha demostrado un aumento (Liu y Dillon, 2002; Simoncini y col., 2003b), y una disminución (Mukherjee y col., 2001) por acción de los andrógenos. Otros autores han observado un aumento (Wynne y Khalil, 2003; Orshal y Khalil, 2004) o una disminución (Teoh y col., 2000a; Gonzales y col., 2004) en la respuesta vasodilatadora al NO endotelial por acción de los andrógenos. A pesar de estos resultados, hay una carencia de estudios sistemáticos que analicen el efecto de las hormonas sexuales masculinas endógenas sobre estos aspectos en su conjunto, al igual que se ha realizado sobre la expresión de nNOS, liberación de NO de origen neuronal, y su efecto vasodilatador (Martín y col., 2005), para así determinar si la ausencia de hormonas sexuales regula de forma distinta las diferentes isoformas de NOS.

6. a Efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión de eNOS

En primer lugar se determinó si la expresión de eNOS se veía modificada por la gonadectomía, observándose que fue similar en homogenados de arterias de machos control y orquidectomizados (Figura 33).

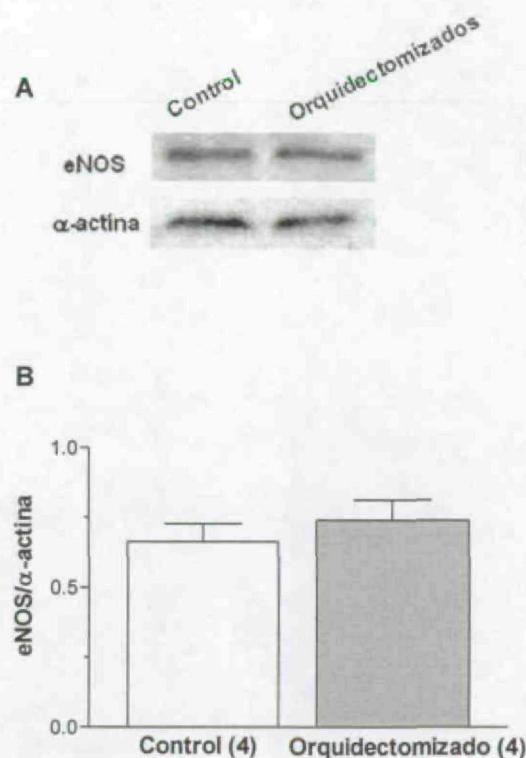


Figura 33: Western blot representativos para la expresión de eNOS en segmentos de arteria mesentérica de machos control y orquidectomizados (A). La figura es representativa de cuatro segmentos separados de cada grupo de animales. El panel B muestra el análisis densitométrico de la expresión de eNOS. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para eNOS y la obtenida para la α -actina.

Estos resultados contrastan con lo observado anteriormente con nNOS en la misma arteria (Martín y col., 2005) e indican que las hormonas sexuales masculinas actúan de forma distinta dependiendo de la proteína diana, en concreto de la isoforma de NOS que estudiemos.

6. b Liberación de NO endotelial

El siguiente paso, por tanto, consistió en analizar la liberación de NO formado a partir de la estimulación de eNOS inducida por ACh en arterias de machos control y

orquidectomizados, observándose que tanto la liberación basal como la estimulada por ACh fue similar en arterias mesentéricas de machos control y orquidectomizados (Figura 34) (ANOVA $p > 0,05$). La preincubación con 10 μM de L-NAME disminuyó la liberación de NO en arterias de ambos grupos.

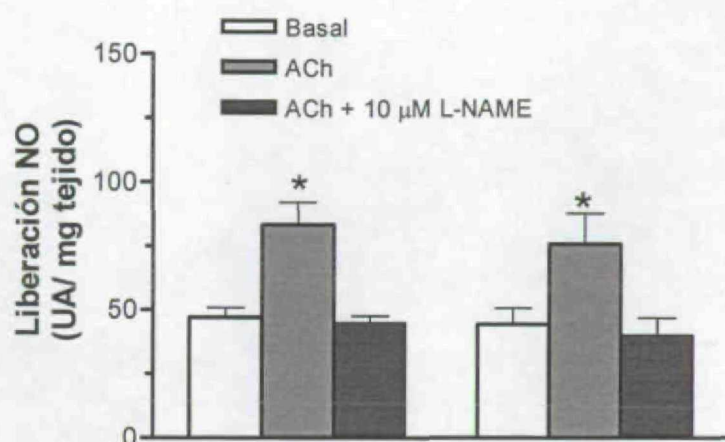


Figura 34: Efecto de la gonadectomía sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y mediante estimulación con ACh (0,1 nM- 10 μM). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia arbitrarias (U.A.) frente a mg de tejido. * $p < 0,05$ frente a la liberación basal de NO.

6. c Efecto del NO endotelial

Posteriormente se determinó si existían diferencias en la respuesta vasodilatadora a ACh en ausencia de hormonas sexuales masculinas, observándose que, a pesar de que la liberación de NO de origen endotelial fue similar en ambos grupos experimentales, la respuesta vasodilatadora inducida por ACh fue mayor en arteria mesentérica de macho control en comparación con machos orquidectomizados (Figura 35).

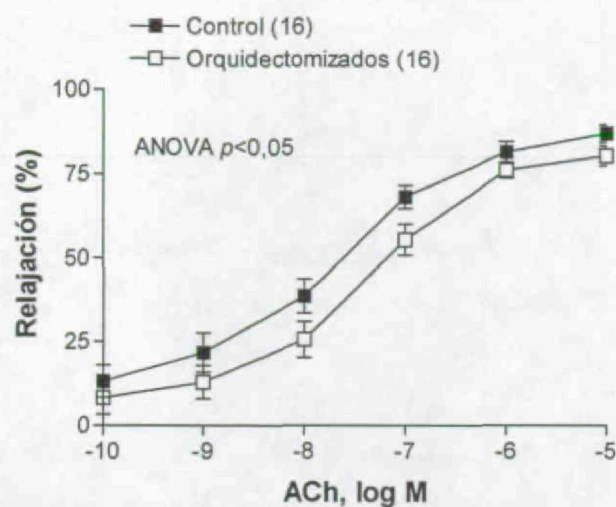


Figura 35: Efecto de la privación de hormonas sexuales masculinas sobre la respuesta vasodilatadora a ACh (0,1 nM-10 μ M) en arteria mesentérica con endotelio de machos control y orquidectomizados. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por 1 μ M de NA (control, 1460 ± 180 ; orquidectomizados, 1120 ± 107 mg). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

Esta respuesta vasodilatadora se vio disminuida de forma similar en ambos grupos mediante la preincubación con el inhibidor inespecífico de NOS L-NAME (10 μ M, Figura 36), indicando una participación del NO en la respuesta a ACh mayor en animales controles.

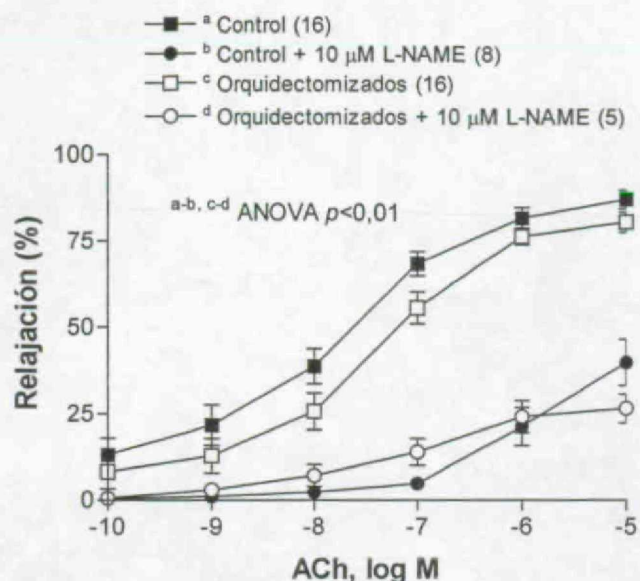


Figura 36: Efecto de 10 μ M de L-NAME sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM-10 μ M) en arteria mesentérica con endotelio de machos control y orquidectomizados. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por 1 μ M de NA (control, 1460 ± 180 ; orquidectomizados, 1120 ± 107 mg)

Este resultado podría deberse, en parte, a un mayor metabolismo del NO por la incrementada formación de aniones superóxido en animales orquidectomizados, tal y como se demostró en los experimentos referentes al NO neuronal (Martín y col, 2005). Otra posibilidad adicional es que la sensibilidad de las células musculares lisas al NO de origen endotelial fuese diferente entre ratas macho control y orquidectomizados, y/o a diferencias en la liberación de sustancias vasoconstrictoras que pueden contrarrestar el efecto vasodilatadora de la ACh.

Puesto que la respuesta vasodilatadora inducida por SNP fue similar en arterias con endotelio de ambos grupos de animales (Figura 37), podemos descartar la diferencia de sensibilidad a NO liberado en respuesta a ACh.

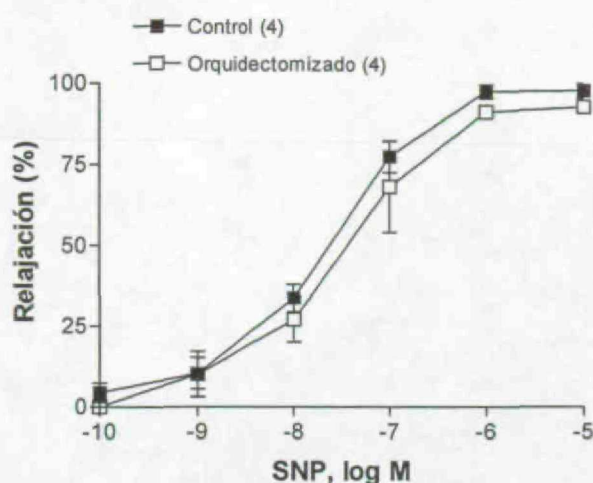


Figura 37: Respuesta vasodilatadora a SNP en segmentos precontraídos con NA de machos control y orquidectomizados con endotelio. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por 1 μ M de NA. (control, 1360 ± 215 ; orquidectomizados, 1079 ± 94 mg). El número de animales se indica entre paréntesis.

Este resultado es distinto al obtenido en arterias sin endotelio, en el que la respuesta a SNP era mayor en arterias de machos orquidectomizados. Esto podría deberse a la presencia de factores vasoactivos de origen endotelial que pueden influir en la respuesta vascular, indicando el predominio de factores vasoconstrictores.

6.d. Participación del TXA_2

Existen datos publicados que indican que la PKC induce la formación de prostanoïdes contráctiles (Schuette y Lapointe, 2000), por ejemplo en situación de disfunción endotelial producida por hiperglicemia (Cosentino y col., 2003). Uno de los prostanoïdes vasoconstrictores más importantes producidos en la pared vascular y que puede participar en la disfunción endotelial asociada con distintos factores de riesgo cardiovascular es el TXA_2 (Shimokawa, 1998; Matz y col., 2000; Nie y col., 2000). Por lo tanto, se determinó si existía producción de TXA_2 en arterias de ratas de ambos grupos experimentales. Para ello se utilizó inmunofluorescencia (Figura 38), que

mostró expresión de TXA_2 sintasa en células tanto endoteliales como del músculo liso vascular, al igual que se ha visto en estudios anteriores en arteria cerebral de rata (Gonzales y col., 2005).

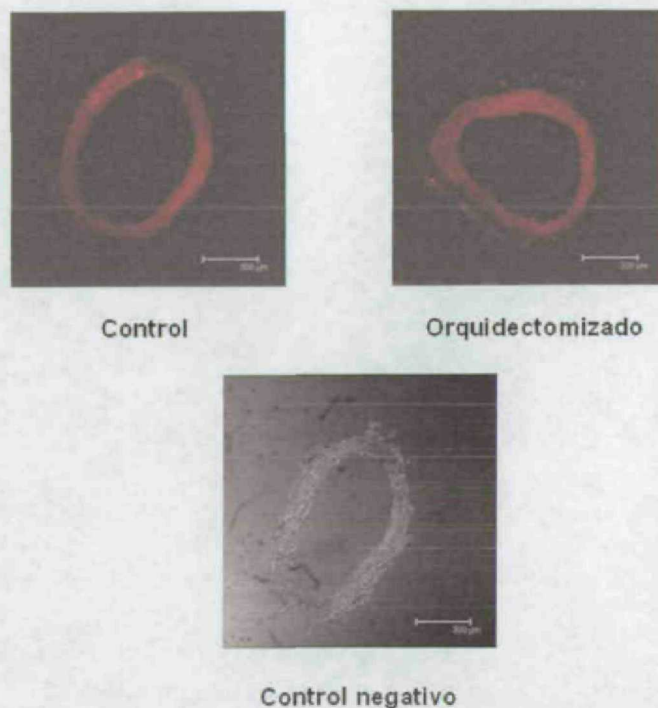


Figura 38: Detección inmunohistoquímica de TXA_2 sintasa en segmentos de arteria mesentérica de machos control y orquidectomizados. La figura es representativa de cuatro segmentos separados de cada grupo de animales.

Posteriormente se intentó determinar si existían diferencias en la expresión de TXA_2 sintasa en ratas de ambos grupos, utilizando western blot (Blanco-Rivero y col., 2006), observándose que no existen diferencias en la expresión de TXA_2 sintasa en nuestro modelo experimental (Figura 39).

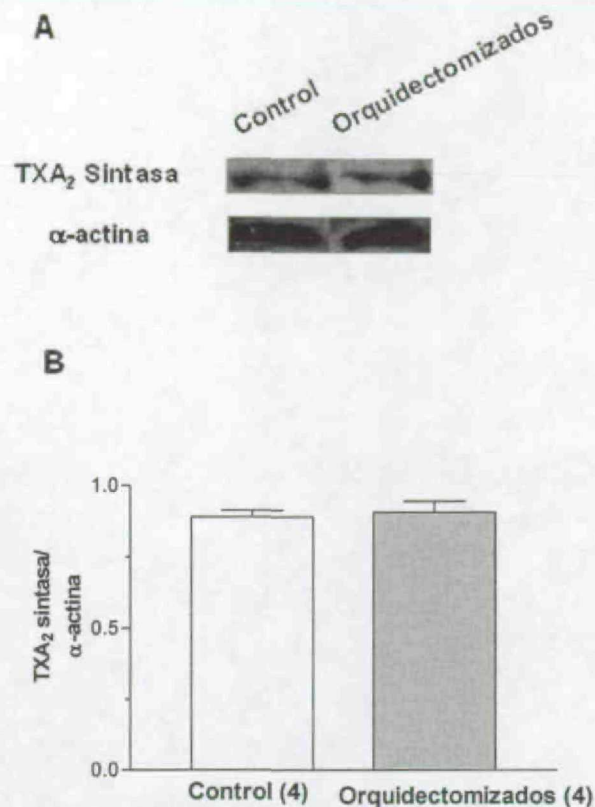


Figura 39: Western blot representativos para la expresión de TXA₂ sintasa en segmentos de arteria mesentérica de machos control y orquidectomizados (A). La figura es representativa de cuatro segmentos separados de cada grupo de animales. El panel B muestra el análisis densitométrico de la expresión de TXA₂ sintasa. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para TXA₂ sintasa y la obtenida para la α -actina.

Este resultado no coincide con datos publicados por Gonzales y col. (2005), que observaron una disminución en la expresión de TXA₂ sintasa en arterias cerebrales de ratas macho orquidectomizados, lo cual puede deberse a diferencias en las cepas, edades y lechos vasculares de los animales utilizados.

En nuestro modelo experimental la actividad de la PKC es mayor en animales orquidectomizados (Blanco-Rivero y col., 2005a), y como hemos explicado anteriormente, la PKC puede inducir formación de prostanoïdes contráctiles. Por lo tanto, es posible pensar que en situación de gonadectomía, la producción de TXA₂ puede verse modificada por una mayor activación de la TXA₂ sintasa. Para

comprobarlo, se midió la producción basal de TXB_2 , metabolito estable de TXA_2 , y la inducida por ACh (0,1 nM – 10 μM). Los resultados obtenidos muestran una mayor formación basal y estimulada por ACh de TXB_2 en animales orquidectomizados (Figura 40), y concuerdan con datos previos obtenidos mediante estimulación con el agonista α -adrenérgico clonidina, en los que la formación de TXB_2 tanto basal como la obtenida mediante estimulación con clonidina está también aumentada en animales orquidectomizados (Blanco-Rivero y col., 2006).

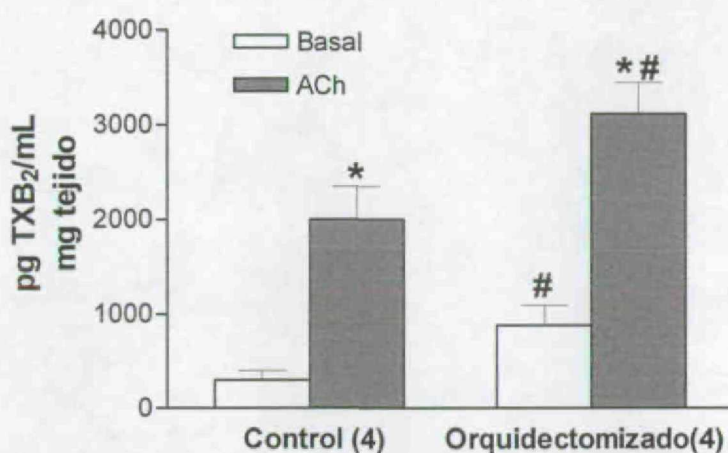


Figura 40: Liberación de TXB_2 en arteria mesentérica de animales control y orquidectomizados. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como pg TXB_2 /mL mg tejido. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. * $p < 0,05$ frente al basal correspondiente. # $p < 0,05$ vs control.

Por lo tanto, si la liberación de TXA_2 se ve aumentada en situación de privación de hormonas sexuales masculinas, y la expresión de TXA_2 sintasa no varía, podemos suponer que la gonadectomía puede ser la causante de un aumento en la actividad TXA_2 sintasa en machos orquidectomizados, al igual que hemos podido observar anteriormente con otras enzimas como nNOS (Martín y col., 2005)

Para analizar las posibles diferencias en la sensibilidad del TXA_2 que pudiera causar la orquidectomía, se procedió a realizar curvas concentración-respuesta al mimético de

TXA₂ U-46619 (1 nM-1 μ M), observándose que indujo respuestas contráctiles similares en arterias con endotelio de ambos grupos de animales (Figura 41).

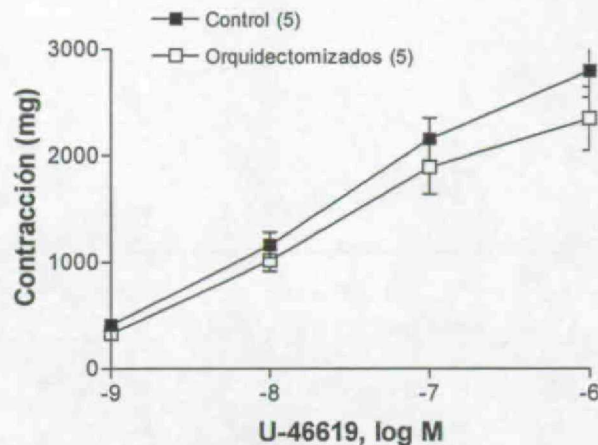


Figura 41: Respuesta vasoconstrictora al mimético de TXA₂ U-46619 en arteria mesentérica con endotelio de machos control y orquidectomizados. Los resultados (medias \pm EEM) se expresaron en mg de contracción. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

Este resultado indica que la respuesta producida por TXA₂ no se ve modificada por la gonadectomía, al igual que se ha demostrado en estudios de arterias cerebrales (Gonzales y col., 2005), y que su efecto vascular se debe únicamente a diferencias en su producción.

Por tanto, los resultados observados hasta ahora mostraron que la gonadectomía no afectó la expresión de eNOS, la expresión basal e inducida por ACh de NO, y que disminuyó el efecto vasodilatador inducido por ACh. Esta disminución es debida, al menos, a un incremento en el metabolismo del NO, y a un incremento en la formación del prostanoide vasoconstrictor TXA₂. Por lo tanto, estos resultados indican que las hormonas sexuales masculinas ejercen un efecto protector en el sistema vascular frente al metabolismo del NO y a la formación de prostanoïdes vasoconstrictores.

7. Acción de la PKC sobre la respuesta a NO endotelial

En el estudio que nos ocupa, hemos podido observar que la actividad PKC es mayor en arteria mesentérica de machos orquidectomizados, y que la PKC regula de manera positiva la actividad nNOS (Blanco-Rivero y col., 2005a). Hemos podido observar también que la regulación de nNOS y eNOS por parte de las hormonas sexuales es distinta. Se ha demostrado en diversos estudios que la PKC, dependiendo del tejido analizado, regula positivamente (Li y col., 1998; Wedgood y col., 2001) o negativamente (Mukherjee y col., 2001; Yakubu y col., 2004) la actividad de eNOS. Se ha observado también que una inhibición de PKC puede incluso incrementar la actividad de eNOS (Li y col., 2005). Por lo tanto, el siguiente objetivo consistió en analizar si la PKC regula la actividad eNOS en arteria mesentérica, al igual que ocurre con nNOS, y si las hormonas sexuales masculinas influyen en dicha regulación.

7. a Efecto de la PKC sobre la liberación de NO endotelial

El primer factor a analizar consistió en determinar cómo la activación o inhibición de PKC puede afectar a la actividad de eNOS en arterias de machos control y orquidectomizados. Nuestros resultados mostraron que la preincubación con 1 nM del activador de PKC, PDBu o 0,1 μ M del inhibidor inespecífico de PKC, calfofostina C no modificó la liberación de NO basal o estimulada por ACh en arterias de macho control (Figura 42). Por el contrario, en arterias de machos orquidectomizados, la preincubación con PDBu (1 nM) incrementó la liberación basal y la inducida por ACh de NO, mientras que la calfofostina C (0,1 μ M) la disminuyó (Figura 42).

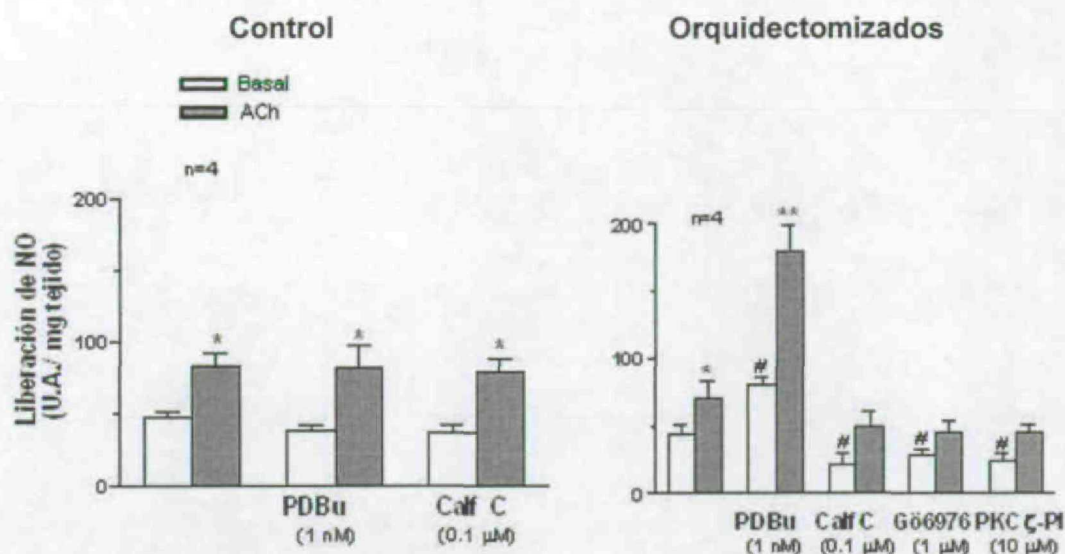


Figura 42: Efecto del PDBu (1 nM) y calfofina C (0.1 μM) sobre la liberación de NO basal e inducida por ACh en segmentos de arteria mesentérica con endotelio de animales control (A), y de PDBu (1 nM), calfofina C (0.1 μM), G66976 (0.1-1 μM) y PKC-ζ PI (10 μM) sobre la liberación de NO basal e inducida por ACh en segmentos de arteria mesentérica con endotelio de animales orquidectomizados (B). Los resultados (media ± EEM) se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (UA)/mg tejido. n = Número de animales. * $p < 0.05$ frente a la liberación basal de NO correspondiente a cada tratamiento.

Estos resultados indican que la participación de PKC sobre la actividad de eNOS sólo se produce en arterias de machos orquidectomizados, y no sobre machos control. Estos resultados contrastan con los previamente obtenidos para nNOS (Blanco-Rivero y col., 2005a), en los que se observaba una modulación de nNOS por parte de PKC en animales controles. Por tanto, podemos especular la existencia de una sutil diferencia en la modulación de las distintas isoformas de eNOS por parte de PKC. En este sentido no hemos de olvidar que pueden existir otros mecanismos de regulación distintos a PKC sobre la eNOS, entre ellos diferencias en las condiciones redox, habiéndose descrito una activación de eNOS por acción de aniones superóxido (Polytarchou y Papadimitrou, 2005), así como defosforilación por acción de la proteínfosfatasa-1 y posterior fosforilación por la Calmodulina quinasa II (Fleming y

col., 2001) y/o otras quinasas como PKA (Ferrer y col., 2004), que a su vez regulan la función intracelular.

Paralelamente al estudio realizado con nNOS, se procedió a estudiar el papel de las isoformas convencionales y PKC- ζ sobre la actividad eNOS en machos orquidectomizados, puesto que es el modelo experimental en el que PKC regula la actividad de eNOS. Al analizar el efecto del inhibidor de PKC Gö6976 (1 μ M), selectivo frente a las isoformas convencionales de PKC, se pudo observar una disminución de la liberación basal e inducida por ACh en arterias de machos orquidectomizados (Figura 42), lo cual indica una participación de las isoformas convencionales de PKC en la regulación de eNOS en machos orquidectomizados. Asimismo, como la isoforma atípica PKC ζ está implicada en la liberación de NO de origen neuronal (Blanco-Rivero y col., 2005a), se procedió a estudiar la posible implicación de dicha isoforma sobre la liberación de NO endotelial. Los resultados observados muestran que PKC ζ -PI también disminuye la liberación basal e inducida por ACh de NO de origen endotelial (Figura 42), confirmándose de ese modo la participación de dicha isoforma. Por tanto, puesto que todos los inhibidores de PKC utilizados, calfostina C, Gö6976 y PKC ζ -PI, disminuyeron la liberación basal e inducida por ACh de NO de origen endotelial, parece ser que la eNOS estaría activada por PKC en machos orquidectomizados, tal y como se vio anteriormente con nNOS (Blanco-Rivero y col., 2005a), pero a diferencia de aquella no estaría totalmente activada, puesto que la presencia de PDBu todavía es capaz de aumentar la liberación de NO endotelial basal y estimulada por ACh.

7. b Participación de PKC sobre la acción vasomotora del NO endotelial

Para investigar el posible papel funcional de la PKC en la liberación de NO de origen endotelial, se analizó el efecto de la activación o inhibición de la PKC sobre la respuesta vasomotora inducida por ACh en ambos grupos de animales. En los resultados obtenidos se pudo observar que ni la presencia de calfofina C ($0,1 \mu\text{M}$) ni de PDBu (1 nM) modificaron la respuesta vasodilatadora inducida por ACh en arterias de machos control (Figura 43). Este resultado está de acuerdo con los obtenidos en la liberación de NO de origen endotelial, y confirma que la producción de NO no está regulada por PKC en machos controles. Además, La respuesta dependiente de concentración a SNP ($0,1 \text{ nM}$ – $10 \mu\text{M}$) no se vio alterada por los activadores o inhibidores de PKC utilizados en arterias de machos control (Figura 43). Por lo tanto, el efecto vasodilatador del NO liberado tampoco se ve afectado por PKC.

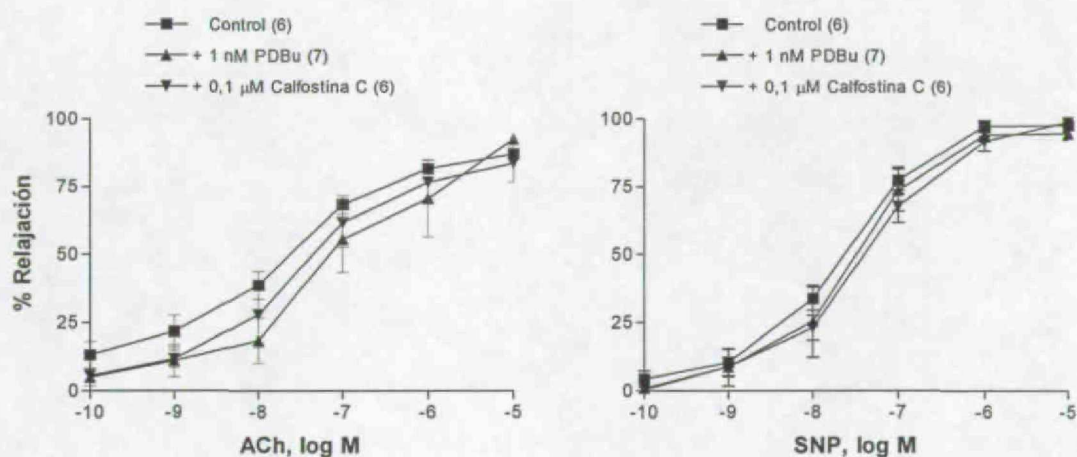


Figura 43: Efecto vasodilatador de ACh y SNP en machos control en presencia de 1 nM PDBu o $0,1 \mu\text{M}$ calfofina C. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción producida por el tono previo a NA.

En segmentos de machos orquidectomizados, sin embargo, la presencia de PDBu incrementó la respuesta producida por ACh (Figura 44), mientras que la respuesta a SNP en presencia de dicho fármaco no se ve modificada (Figura 44), indicando que el aumento en la respuesta a ACh debe al aumento en la producción de NO, y no a una modificación de su efecto vasodilatador.

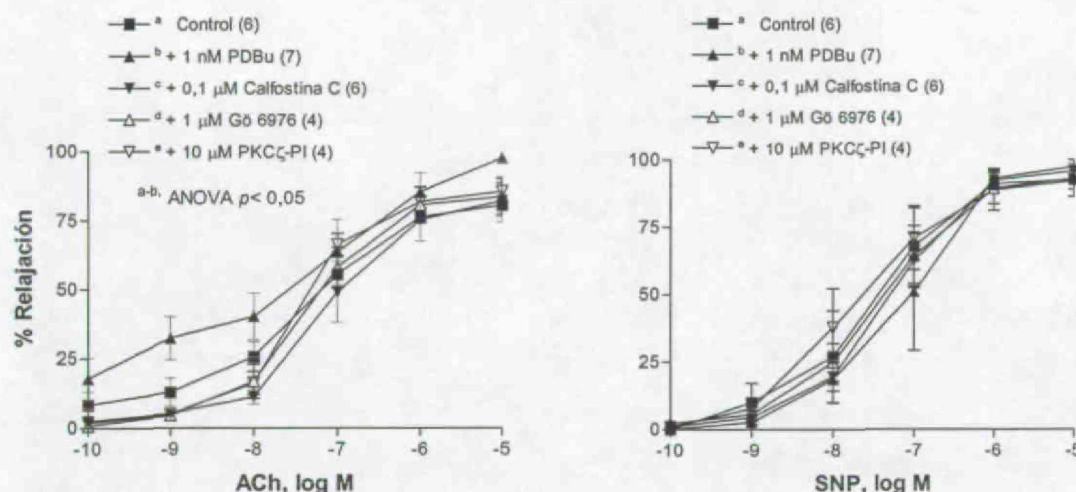


Figura 44: Efecto vasodilatador de ACh y SNP en machos orquidectomizados, en presencia de 1 nM PDBu, 0,1 μM calphostina C, 1 μM Gö6976, y 10 μM PKCζ-PI. Los resultados (media ± EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción producida por el tono previo a NA.

Adicionalmente, se observó que los inhibidores de PKC calphostina C, Gö6976 y PKCζ-PI no modificaron la respuesta vasodilatadora a ACh o SNP (Figura 44), a pesar de que inhibían la liberación de NO. Esto podría indicar que la cantidad de NO liberada en presencia de los inhibidores de PKC puede ser lo suficientemente elevada como para mantener la respuesta vasodilatadora a ACh. Aun así, tampoco se puede descartar la participación de otras sustancias vasoactivas cuya formación pudiera incrementarse al activar la PKC (Frías y col., 2003; Schmeck y col., 2003; Eligini y col., 2005). Para estudiar esta posibilidad, se realizaron curvas de ACh en segmentos de machos

orquidectomizados preincubadas con 10 μ M de L-NAME, en presencia o ausencia del activador de la PKC, PDBu, observándose que la preincubación con PDBu no modificó la relajación inducida por ACh en presencia de L-NAME (Figura 45). Este resultado nos permite descartar la participación en la respuesta a ACh de otras sustancias vasodilatadoras en cuya síntesis fuera incrementada por PKC.

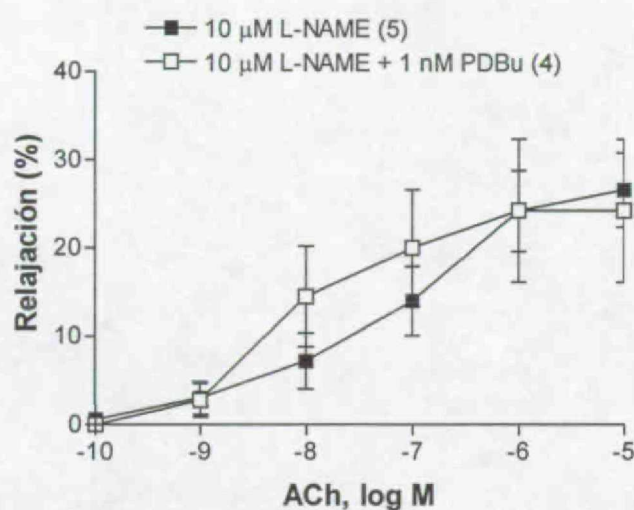


Figura 45: Efecto de 1 nM de PDBu sobre la respuesta vasodilatadora a ACh en machos orquidectomizados en presencia de 10 μ M de L-NAME. Los resultados (media \pm EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción producida por el tono previo a NA. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

Los resultados obtenidos en este estudio son importantes desde el punto de vista fisiológico ya que existen patologías asociadas con un aumento en la actividad PKC, como hipertensión (Oriji, 2003), y diabetes (Nangle y col, 2003), en las que la pared vascular incrementa la liberación de NO de origen neuronal (Nakane y col, 1991; Ferrer y col, 2000; Marín y col., 2000). Sin embargo, cuando se producen estas patologías unidas a una privación de hormonas sexuales masculinas, la capacidad de aumentar la liberación de NO de origen neuronal, puede verse comprometida.

Asimismo, es importante destacar la mayor liberación de TXA_2 en animales orquidectomizados, indicando así el papel protector de las hormonas sexuales masculinas sobre el sistema cardiovascular, al menos en cuanto al papel de este prostanoide.

Estos resultados en su conjunto confirman la hipótesis de que las hormonas sexuales masculinas endógenas, probablemente los andrógenos, actúan como un factor protector frente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Conclusiones

- La privación de las hormonas sexuales masculinas disminuye la expresión de nNOS, mientras que no modifica la liberación de NO a partir de nNOS inducida por EE, aunque incrementa el metabolismo del NO a través de la generación de aniones superóxido y peroxinitrito.
- El papel funcional del NO de origen neuronal es más pronunciado en arterias de machos orquidectomizados, debido a productos generados por el metabolismo del NO, como el peroxinitrito y H_2O_2 , que parecen compensar la pérdida de la biodisponibilidad del NO, probablemente mediante su efecto vasodilatador.
- La actividad PKC está incrementada en arteria mesentérica de machos orquidectomizados. Este incremento puede ser responsable del aumento en la actividad de nNOS que hemos observado anteriormente.
- Aunque las isoformas convencionales y la isoforma atípica PKC ζ regulan positivamente la actividad de nNOS en arterias de ambos grupos de animales, la contribución de las isoformas de PKC convencionales en el aumento de la actividad de nNOS parece ser mayor en arterias de machos orquidectomizados.
- La privación de hormonas sexuales masculinas no afecta a la expresión de eNOS o la liberación de NO de origen endotelial inducida por ACh, pero disminuye la acción vasodilatadora de la ACh debido al incremento en el metabolismo del NO y a una mayor formación de TXA_2 en animales orquidectomizados. Este aumento de TXA_2 se debe a un aumento en la actividad de TXA_2 sintasa.
- La PKC parece modular la actividad de eNOS sólo en arterias de machos orquidectomizados, en los que las isoformas convencionales de PKC y PKC ζ están implicadas en la regulación positiva de eNOS.

Bibliografía

- Abdel-Latif AA. (1986) Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol Rev.*; 38(3):227-272.
- Abe J-I, Berk BC. (1998) Reactive Oxygen species of signal transduction in cardiovascular disease *Trends Cardiovasc Med* 8, 59-64.
- Adie EJ, Mullaney I, McKenzie FR, Milligan G. (1992) Concurrent down-regulation of IP prostanoid receptors and the alpha-subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein (Gs) during prolonged exposure of neuroblastoma x glioma cells to prostanoid agonists. Quantification and functional implications. *Biochem J.* 285 (Pt 2):529-536.
- Agostini MC, Borda ES, Gimeno MF, Gimeno AL. (1981) Differences in the effects of acetylcholine on the vas deferens from normal and castrated rats. A participation of adrenergic mechanisms. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*; 250(2):212-220.
- Aizawa K, Turner LA, Weihrauch D, Bosnjak ZJ, Kwok WM. (2004) Protein kinase C-epsilon primes the cardiac sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel to modulation by isoflurane. *Anesthesiology.*; 101(2):381-389.
- Akimoto Y, Horinouchi T, Shibano M, Matsushita M, Yamashita Y, Okamoto T, Yamaki F, Tanaka Y, Koike K. (2002) Nitric oxide (NO) primarily accounts for endothelium-dependent component of beta-adrenoceptor-activated smooth muscle relaxation of mouse aorta in response to isoprenaline. *J Smooth Muscle Res.* ;38 (4-5):87-99.
- Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C. (1999) Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res*; 84(7):813-819.
- Altieri RJ, Kiritsy-Roy JA, Catravas JD. (1986) Acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit pulmonary arteries: role of thromboxane A2. *J Pharmacol Exp Ther.*; 236(2):535-541.
- Ammar EM, Said SA, Hassan MS. (2004) Enhanced vasoconstriction and reduced vasorelaxation induced by testosterone and nandrolone in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol Res*; 50(3):253-259.
- Anggard EE, Botting RM, Vane JR. (1990) Endothelins. *Blood Vessels.*; 27(2-5):269-281.
- Arribas S, Marín J, Ponte A, Balfagón G, Salaices M (1994) Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial beta adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* 270(2): 520-527.
- Ayajiki K, Okamura T, Noda K, Toda N. (2002) Functional study on nitroxidergic nerve in isolated dog pulmonary arteries and veins. *Jpn J Pharmacol.* 89(2):197-200.
- Bae S, Zhang L. (2005) Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 315(3):1125-1135.
- Baker PJ, Ramey ER, Ramwell PW (1978) Androgen-mediated sex differences of cardiovascular responses in rats. *Am J Physiol.*; 235(2):H242-246.
- Balafanova Z, Bolli R, Zhang J, Zheng Y, Pass JM, Bhatnagar A, Tang XL, Wang O, Cardwell E, Ping P. (2002) Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon

- (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon -RACK2 interactions: a novel mechanism of no-triggered activation of PKCepsilon. *J Biol Chem.*; 277(17):15021-15027.
- Bapat S, Verkleij A, Post JA. (2001) Peroxynitrite activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) via a MEK-independent pathway: a role for protein kinase C. *FEBS Lett.*; 499(1-2):21-26.
- Barman SA, Zhu S, White RE. (2004) PKC activates BKCa channels in rat pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 286(6):L1275-1281.
- Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Creager MA. (2002) Inhibition of protein kinase C beta prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ Res.*;90(1):107-111.
- Beckman JS, Koppenol WH. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 1):C1424-1437.
- Békési G, Kakucs R, Várvíró S, Racz K, Sprintz D, Feher J, Szekacs B. (2000) In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids*; 65: 889-894.
- Bell D, McDermott BJ. (1996) Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacol Rev.*; 48 (2): 253-288.
- Bhargava KP, Dhawan KN, Saxena RC. (1967) Enhancement of noradrenaline pressor responses in testosterone-treated cats. *Br J Pharmacol Chemother.*; 31(1):26-31.
- Blanco-Rivero J, Balfagon G, Ferrer M. (2005a) Male castration increases neuronal nitric oxide synthase activity in the rat mesenteric artery through protein kinase C activation. *J Vasc Res.*;42(6):526-534
- Blanco-Rivero J, Balfagón G, Ferrer M. (2006) Orchidectomy modulates α_2 -adrenoceptor reactivity in rat mesenteric artery through increased thromboxane A_2 formation. *J Vasc Res*; 43(1):101-8
- Blanco-Rivero J, Cachofeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Marquez-Rodas I, Salaices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagon G (2005b) Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*;46(1):107-112.
- Boak L, Chin-Dusting JP. (2004) Hypercholesterolemia and endothelium dysfunction: role of dietary supplementation as vascular protective agents. *Curr Vasc Pharmacol.*; 2(1):45-52.
- Boeckxstaens GE, Pelckmans PA (1997) Nitric oxide and the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 118(4):925-937.
- Bolego C, Cignarella A, Zancan V, Pinna C, Zanardo R, Puglisi L (1999) Diabetes abolishes the vascular protective effects of estrogen in female rats. *Life Sci.*; 64(9):741-749.

- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*; 368(6474):850-853.
- Boussery K, Delaey C, Van de Voorde J. (2005) The vasorelaxing effect of CGRP and natriuretic peptides in isolated bovine retinal arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 46(4):1420-1427.
- Bowles DK (2001) Gender influences coronary L-type Ca^{2+} current and adaptation to exercise training in miniature swine. *J Appl Physiol*. ;91(6):2503-2510.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351(6329):714-8.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347(6295): 768-770.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84(5):757-767.
- Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Tovar S, Vila E, Salaices M. (2002) Hypertension alters the participation of contractile prostanoids and superoxide anions in lipopolysaccharide effects on small mesenteric arteries. *Life Sci*; 71(17):1997-2014.
- Browne M, Connolly C, Docherty JR. (1999) Vascular actions of 17beta-oestradiol in rat aorta and mesenteric artery. *J Auton Pharmacol*; 19(5):291-299.
- Bülbring E, Tomita T. Catecholamine action on smooth muscle (1987) *Pharmacol Rev*. 39(1):49-96.
- Buñag RD. (1974) Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol*; 34(2):279-82.
- Calderone V, Baragatti B, Breschi MC, Nieri P, Martinotti E. (2002) Hormonal influence on the release of endothelial nitric oxide: gender-related dimorphic sensitivity of rat aorta for noradrenaline. *J Pharm Pharmacol*; 54(4):523-528.
- Carter RW, Kanagy NL. (2003) Mechanism of enhanced calcium sensitivity and alpha 2-AR vasoreactivity in chronic NOS inhibition hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 284(1):H309-316.
- Cato AC, Nestl A, Mink S. (2002) Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*; 2002(138):RE9.
- Chabrier PE. (1996) Growth factors and vascular wall. *Int Angiol*; 15(2):100-103.
- Chatrath R, Ronningen KL, Severson SR, LaBrecche P, Jayachandran M, Bracamonte MP, Miller VM. (2003) Endothelium-dependent responses in coronary arteries are changed with puberty in male pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 285: H1168-1176.
- Chen DC, Duckles SP, Krause DN. (1999) Postjunctional alpha2-adrenoceptors in the rat tail artery: effect of sex and castration. *Eur J Pharmacol*; 372(3):247-252.

- Chen Y, Zajac JD, MacLean HE. (2005) Androgen regulation of satellite cell function. *J Endocrinol.*; 186(1):21-31.
- Chester AH, Jiang C, Borland JA, Yacoub MH, Collins P.(1995) Oestrogen relaxes human epicardial coronary arteries through non-endothelium-dependent mechanisms. *Coron Artery Dis.*; 6(5):417-422.
- Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C. (1992) Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176(2):599-604.
- Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P, Chatterjee K. (1996) Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation.*; 94(10):2614-2619.
- Cignarella A, Bolego C, Pinna C, Zanardo R, Nardi F, Zancan V, Puglisi L (2000) Androgen deprivation, estrogen treatment and vascular function in male rat aorta. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* ;361(2):166-172.
- Clarkson TB. (1998) Effects of estrogens, progestins, and androgens on coronary vasomotion and atherosclerosis. *J Reprod Med.*; 43(8 Suppl):741-745.
- Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. (2003) Thromboxane A2-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C ζ . *Circ Res.*; 93(7):656-663.
- Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Tamargo J, Perez-Vizcaino F (2005) Postnatal maturational shift from PKC ζ and voltage-gated K⁺ channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res.*; 66(1):84-93.
- Cohen RA, Vanhoutte PM. (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation.*; 92(11):3337-3349.
- Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. (1999) Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res.* 84(2):210-219.
- Conde MV, Marin J, Fernandez-Criado C, Balfagon G (2000) Regulation of beta-adrenoceptor-mediated relaxation of the rat aorta is modulated by endogenous ovarian hormones. *Clin Sci (Lond)*; 98(4):381-387.
- Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. (1996) Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.*; 119(5):959-964.
- Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher TF. (2003) High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*; 107(7):1017-1023.
- Cotecchia S, Kobilka BK, Daniel KW, Nolan RD, Lapetina EY, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW (1990) Multiple second messenger pathways of alpha-adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J Biol Chem.* 265 (1): 636-9.

- Cracowski JL. (2004) Isoprostanes: an emerging role in vascular physiology and disease? *Chem Phys Lipids.*; 128(1-2):75-83.
- Crews JK, Khalil RA (1999) Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca^{2+} entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19(4):1034-1040.
- Csonka C, Szilvassy Z, Fulop F, Pali T, Blasig IE, Tosaki A, Schulz R, Ferdinandy P. (1999) Classic preconditioning decreases the harmful accumulation of nitric oxide during ischemia and reperfusion in rat hearts. *Circulation.*; 100(22):2260-2266.
- Dallas A, Khalil RA (2003) Ca^{2+} antagonist-insensitive coronary smooth muscle contraction involves activation of epsilon-protein kinase C-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285(6):C1454-1463.
- Damron DS, Nadim HS, Hong SJ, Darvish A, Murray PA. (1998) Intracellular translocation of PKC isoforms in canine pulmonary artery smooth muscle cells by ANG II. *Am J Physiol.*; 274(2 Pt 1):L278-288.
- Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 369(2-3):131-135
- Daugherty A, Cassis L. (2004) Angiotensin II-mediated development of vascular diseases. *Trends Cardiovasc Med.*; 14(3):117-120.
- Davidge ST. (2001) Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.* ;89(8):650-660.
- Davies PF. (1995) Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 75(3):519-560
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* ; 351(Pt 1):95-105.
- De Witt BJ, Kaye AD, Ibrahim IN, Bivalacqua TJ, D'Souza FM, Banister RE, Arif AS, Nossaman BD. (2001) Effects of PKC isozyme inhibitors on constrictor responses in the feline pulmonary vascular bed. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 280(1):L50-57.
- Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ. (2001) Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 281(4):H1720-1727.
- Demoncheaux EA, Higenbottam TW, Foster PJ, Borland CD, Smith AP, Marriott HM, Bee D, Akamine S, Davies MB (2002) Circulating nitrite anions are a directly acting vasodilator and are donors for nitric oxide. *Clin Sci (Lond)*; 102(1):77-83.
- Descombes JJ, Stoclet JC. (1985) Characterization of two distinct alpha-adrenoceptor binding sites in smooth muscle cell membranes from rat and bovine aorta. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; 329(3):282-8.
- Di Liberto G, Dallot E, Eude-Le Parco I, Cabrol D, Ferre F, Breuiller-Fouche M (2003) . A critical role for PKC zeta in endothelin-1-induced uterine contractions at the end of pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285(3):C599-607.
- Dillon PF, Aksoy MO, Driska SP, Murphy RA (1981) Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science.* 211(4481):495-497.

- Ding X, Murray PA. (2005) Cellular mechanisms of thromboxane A₂-mediated contraction in pulmonary veins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 289(5):L825-833.
- Doel JJ, Godber BL, Goult TA, Eisenthal R, Harrison R. (2000) Reduction of organic nitrites to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidase: possible role in metabolism of nitrovasodilators. *Biochem Biophys Res Commun.*;270(3):880-885.
- Dogne JM, Hanson J, Pratico D. (2005) Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis. *Trends Pharmacol Sci*; 26(12):639-644.
- Donoso MV, Brown N, Carrasco C, Cortes V, Fournier A, Huidobro-Toro JP (1997a) Stimulation of the sympathetic perimesenteric arterial nerves releases neuropeptide Y potentiating the vasomotor activity of noradrenaline: involvement of neuropeptide Y-Y₁ receptors. *J Neurochem.* 69 (3): 1048-1059.
- Donoso MV, Silva M, St-Pierre S, Huidobro-Toro JP (1988) Neuropeptide Y (NPY), an endogenous presynaptic modulator of adrenergic neurotransmission in the rat vas deferens: structural and functional studies. *Peptides.* 9 (3): 545-553.
- Donoso MV, Steiner M, Huidobro-Toro JP (1997b) BIBP 3226, suramin and prazosin identify neuropeptide Y, adenosine 5'-triphosphate and noradrenaline as sympathetic cotransmitters in the rat arterial mesenteric bed. *J Pharmacol Exp Ther.* 282 (2): 691-698.
- Doyle MP, Hoekstra JW. (1981) Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem* 14(4):351-358.
- Drew B, Leeuwenburgh C. (2002) Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann N Y Acad Sci*; 959:66-81.
- Egleme C, Godfraind T, Miller RC. (1984) Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. *Br J Pharmacol.*; 81(1):16-18.
- Eligini S, Barbieri SS, Cavalca V, Camera M, Brambilla M, Fanceschi MD, Tremoli E, Colli S. (2005) Diversity and similarity in signalling events leading to rapid Cox-2 induction by tumor necrosis factor- α and phorbol ester in human endothelial cells. *Cardiovasc Res*; 65: 683-693.
- English KM, Jones RD, Jones TH, Morice AH, Channer KS. (2000a) Aging reduces the responsiveness of coronary arteries from male Wistar rats to the vasodilatory action of testosterone. *Clin Sci (Lond)*; 99(1):77-82.
- English KM, Jones RD, Jones TH, Morice AH, Channer KS. (2001) Gender differences in the vasomotor effects of different steroid hormones in rat pulmonary and coronary arteries. *Horm Metab Res.*; 33(11):645-652.
- English KM, Mandour O, Steeds RP, Diver MJ, Jones TH, Channer KS. (2000b) Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms. *Eur Heart*; 21(11):890-894.
- English KM, Steeds R, Jones TH, Channer KS. (1997) Testosterone and coronary heart disease: is there a link? *QJM.*; 90(12):787-791.

- Estrada M, Espinosa A, Muller M, Jaimovich E. (2003) Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology*;144(8):3586-3897.
- Estrada M, Liberona JL, Miranda M, Jaimovich E. (2000) Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* ; 279(1):E132-139.
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA, Surprenant A (1995) . Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors) *Mol Pharmacol* 48 (2):178-183.
- Evans RM. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.*; 240(4854):889-895.
- Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW (1996) The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.* 10(5):615-624.
- Farhat MY, Wolfe R, Vargas R, Foegh ML, Ramwell PW. (1995) Effect of testosterone treatment on vasoconstrictor response of left anterior descending coronary artery in male and female pigs. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 25(3):495-500.
- Feihl F, Waeber B, Liaudet L. (2001) Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Ther* 91(3):179-213.
- Ferdinandy P, Csont T, Csonka C, Torok M, Dux M, Nemeth J, Horvath LI, Dux L, Szilvassy Z, Jancso G. (1997) Capsaicin-sensitive local sensory innervation is involved in pacing-induced preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and CGRP? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*; 356(3):356-363.
- Ferrer M, Alonso MJ, Salaices M, Marin J, Balfagon G (2001) Angiotensin II increases neurogenic nitric oxide metabolism in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Life Sci.*; 68(10):1169-1179.
- Ferrer M, Balfagon G. (2001) Aging alters neuronal nitric oxide release from rat mesenteric arteries: role of presynaptic beta-adrenoceptors. *Clin Sci (Lond)*; 101(4):321-328.
- Ferrer M, Encabo A, Marin J, Peiro C, Redondo J, de Sagarra MR, Balfagon G. (1992) Comparison of the vasoconstrictor responses induced by endothelin and phorbol 12,13-dibutyrate in bovine cerebral arteries. *Brain Res.*; 599(2):186-196.
- Ferrer M, Marin J, Balfagon G. (2000) Diabetes alters neuronal nitric oxide release from rat mesenteric arteries. Role of protein kinase C. *Life Sci.*; 66(4):337-345.
- Ferrer M, Meyer M, Osol G. (1996) Estrogen replacement increases beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric arteries. *J Vasc Res*; 33(2):124-131.
- Ferrer M, Osol G. (1998) Estrogen replacement modulates resistance artery smooth muscle and endothelial alpha2-adrenoceptor reactivity. *Endothelium*; 6(2):133-141.
- Ferrer M, Salaices M, Sanchez M, Balfagon G. (2003) Different effects of acute clenbuterol on vasomotor response in mesenteric arteries from young and old spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.*; 466(3):289-299.

- Ferrer M, Sanchez M, Martin MC, Marquez-Rodas I, Alonso MJ, Salaices M, Balfagon G. (2004) Protein kinase A increases electrical stimulation-induced neuronal nitric oxide release in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol*; 487: 167-173.
- Ferrer M, Tejera N, Marin J, Balfagon G. (1999) Androgen deprivation facilitates acetylcholine-induced relaxation by superoxide anion generation. *Clin Sci (Lond)*; 97(6):625-631.
- Finkel T (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 10(2):248-253.
- FitzGerald GA, Healy C, Daugherty J. (1987) Thromboxane A2 biosynthesis in human disease. *Fed Proc.*; 46(1):154-158.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*; 88: E68-75.
- Fleming I, Gray GA, Schott C, Stoclet JC. (1991) Inducible but not constitutive production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 200 (2-3):375-376.
- Freedman LP. (1992) Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev.*; 13(2):129-145.
- Frias MA, Dubouloz F, Rebsamen MC, Lang U. (2003) Prostacyclin production in rat aortic smooth muscle cells: role of protein kinase C, phospholipase D and cyclooxygenase-2 expression. *Cardiovasc Res.*;60(2):438-446.
- Fridovich I (1997) Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 272(30):18515-18517.
- Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M. (1992) Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.*; 70(4):660-669.
- Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG (2000) Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.*; 105(11):1631-1639.
- Fulginiti J 3rd, Singer HA, Moreland RS (1993) Phorbol ester-induced contractions of swine carotid artery are supported by slowly cycling crossbridges which are not dependent on calcium or myosin light chain phosphorylation. *J Vasc Res*. 30(6):315-322.
- Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA (1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J*. 5(9):2304-2312.
- Funk CD, Furci L, FitzGerald GA, Grygorczyk R, Rochette C, Bayne MA, Abramovitz M, Adam M, Metters KM (1993) Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J Biol Chem* 268(35):26767-26772.
- Garcia-Pascual A, Labadia A, Triguero D, Costa G. (1996) Local regulation of oviductal blood flow. *Gen Pharmacol.*; 27(8):1303-1310.
- Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J, del Carmen Medina L. (2000) Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol*. 389 (1): 1-12.

- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*. 336(6197):385-388.
- Geary GG, Krause DN, Duckles SP (2000) Estrogen reduces mouse cerebral artery tone through endothelial NOS- and cyclooxygenase-dependent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 279(2):H511-519.
- Geiszt M, Dagher MC, Molnar G, Havasi A, Faure J, Paclet MH, Morel F, Ligeti E (2001) Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. *Biochem J*. 355(Pt 3):851-858.
- Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF (2002) Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22(10):1585-1590.
- Gerhard M, Ganz P (1995) How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench *Circulation*. 92(1):5-8.
- Gluais P, Edwards G, Weston AH, Falck JR, Vanhoutte PM, Feletou M. (2005) Role of SK(Ca) and IK(Ca) in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery. *Br J Pharmacol*.; 144(4):477-485.
- Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R.(2000) Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem*.; 275(11):7757-7763.
- Golden KL, Marsh JD, Jiang Y, Brown T, Moulden J. (2003) Gonadectomy of adult male rats reduces contractility of isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.; 285(3):E449-453.
- Gonzales RJ, Ghaffari AA, Duckles SP, Krause DN. (2005) Testosterone treatment increases thromboxane function in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.; 289(2):H578-585.
- Gonzales RJ, Krause DN, Duckles SP. (2004) Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.; 286(2):H552-560
- Goodall AR, Turner NA, Walker JH, Ball SG, Vaughan PF. (1997) Activation of protein kinase C- α and translocation of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate correlate with phorbol ester-enhanced noradrenaline release from SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Neurochem*.; 68(1):392-401.
- Goretski J, Hollocher TC. (1988) Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *J Biol Chem* 263(5):2316-2323.
- Govers R, Rabelink TJ. (2001) Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*.;280(2):F193-206.
- Greenberg S, George WR, Kadowitz PJ, Wilson WR. (1974) Androgen-induced enhancement of vascular reactivity. *Can J Physiol Pharmacol*.; 52(1):14-22.

- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 74(6):1141-1148.
- Griffith OW, Stuehr DJ. (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-736.
- Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ (1996) Inhibition of protein kinase C μ by various inhibitors. Differentiation from protein kinase C isoenzymes. *FEBS Lett.* 26;392(2):77-80.
- Guan XB, Dluzen D. (1991) Castration reduces potassium-stimulated norepinephrine release from superfused olfactory bulbs of male rats. *Brain Res.*;568(1-2):147-151.
- Gudi SR, Clark CB, Frangos JA. (1996) Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ Res.* 79(4):834-839.
- Guimaraes S, Moura D (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 53 (2): 319-356.
- Gupte SA, Rupawalla T, Mohazzab KM, Wolin MS (1999) Regulation of NO-elicited pulmonary artery relaxation and guanylate cyclase activation by NADH oxidase and SOD. *Am J Physiol.* 276(5 Pt 2):H1535-1542.
- Gupte SA, Tateyama M, Okada T, Oka M, Ochi R. (2002) Epiandrosterone, a metabolite of testosterone precursor, blocks L-type calcium channels of ventricular myocytes and inhibits myocardial contractility *J Mol Cell Cardiol.*; 34(6):679-688.
- Hai CM, Hahne P, Harrington EO, Gimona M (2002) Conventional protein kinase C mediates phorbol-dibutyrate-induced cytoskeletal remodeling in a7r5 smooth muscle cells. *Exp Cell Res* 15;280(1):64-74.
- Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. (1999) Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res* ;31(6):651-669.
- Hayashi K, Wakino S, Ozawa Y, Homma K, Kanda T, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Kumagai H, Saruta T. (2005) Role of protein kinase C in Ca channel blocker-induced renal arteriolar dilation in spontaneously hypertensive rats--studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Keio J Med*; 54(2):102-108.
- Hayashi T, Esaki T, Muto E, Kano H, Asai Y, Thakur NK, Sumi D, Jayachandran M, Iguchi A. (2000) Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: the possible role of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;20(3):782-792.
- Hayek OR, Shabsigh A, Kaplan SA, Kiss AJ, Chen MW, Burchardt T, Burchardt M, Olsson CA, Buttyan R. (1999) Castration induces acute vasoconstriction of blood vessels in the rat prostate concomitant with a reduction of prostatic nitric oxide synthase activity. *J Urol.*;162(4):1527-1531.
- Hein L, Kobilka BK (1995) Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology.* 34(4): 357-366.

- Heinlein CA, Chang C. (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol.*; 16(10):2181-2187.
- Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, Daiber A, Mollnau H, August M, Baldus S, Tsilimingas N, Walter U, Ullrich V, Munzel T. (2003) Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol.*; 42(10):1826-1834.
- Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:191-220.
- Holmquist F, Persson K, Bodker A, Anderson KE (1994) . Some pre- and postjunctional effects of castration in rabbit isolated corpus cavernosum and urethra. *J Urol.*; 152(3):1011-1016.
- Honda H, Unemoto T, Kogo H. (1999) Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* ; 34(6):1232-1236.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG (1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 76(4):967-1003.
- Howe PH, Abdel-Latif AA (1988) Purification and characterization of protein kinase C from rabbit iris smooth muscle. Myosin light-chain phosphorylation in vitro and in intact muscle. *Biochem J.* 255(2):423-429.
- Hutchison SJ, Sudhir K, Chou TM, Sievers RE, Zhu BQ, Sun YP, Deedwania PC, Glantz SA, Parmley WW, Chatterjee K. (1997) Testosterone worsens endothelial dysfunction associated with hypercholesterolemia and environmental tobacco smoke exposure in male rabbit aorta. *J Am Coll Cardiol.*; 29(4):800-807.
- Ichikawa A, Sugimoto Y, Negishi M (1996) Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 14(1-3):83-87.
- Ignarro LJ, Kadowitz PJ (1985) The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 25:171-191.
- Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ (1998) Ras, superoxide and signal transduction. *Biochem Pharmacol.* 55(9):1339-1346.
- Ishikawa M, Quock RM. (2003) Role of nitric-oxide synthase isoforms in nitrous oxide antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther.*; 306(2):484-489.
- Isles C. (1995) Blood pressure in males and females. *J Hypertens.*;13(3):285-290.
- Itoh H, Kohli JD, Rajfer SI. (1987) Pharmacological characterization of the postsynaptic alpha-adrenoceptors in isolated canine mesenteric arteries and veins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* ;335(1):44-9.
- Janssen LJ. (2001) Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 280(6):L1067-1082.
- Jimenez R, Andriambeloson E, Duarte J, Andriantsitohaina R, Jimenez J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. (1999) Involvement of thromboxane A2 in the endothelium-dependent contractions induced by myricetin in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol.*; 127(7):1539-1544.

- Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA, Rubanyi GM (1997) Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol.* 110(2):135-140.
- Jones RD, English KM, Jones TH, Channer KS (2004a) Testosterone-induced coronary vasodilatation occurs via a non-genomic mechanism: evidence of a direct calcium antagonism action. *Clin Sci (Lond)*;107(2):149-158.
- Jones RD, English KM, Pugh PJ, Morice AH, Jones TH, Channer KS. (2002) Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 39(6):814-823.
- Jones RD, Hugh Jones T, Channer KS. (2004b) The influence of testosterone upon vascular reactivity. *Eur J Endocrinol.*; 151(1):29-37
- Jones RD, Pugh PJ, Hall J, Channer KS, Jones TH (2003) Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse. *Eur J Endocrinol*; 148(1):111-120.
- Joswig M, Hach-Wunderle V, Ziegler R, Nawroth PP. (1999) Postmenopausal hormone replacement therapy and the vascular wall: mechanisms of 17 beta-estradiol's effects on vascular biology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*;107(8):477-487.
- Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. (1999) Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation.*; 99(9):1165-1172.
- Kahonen M, Tolvanen JP, Sallinen K, Wu X, Porsti I (1998) Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *Am J Physiol.* 275(1 Pt 2):H15-22.
- Kanashiro CA, Khalil RA (1998a) Isoform-specific protein kinase C activity at variable Ca^{2+} entry during coronary artery contraction by vasoactive eicosanoids. *Can J Physiol Pharmacol.* 76(12):1110-1119.
- Kanashiro CA, Khalil RA (1998b) Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 25(12):974-985.
- Kanashiro CA, Khalil RA. (2001) Gender-related distinctions in protein kinase C activity in rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 280(1):C34-45.
- Kanda K, Ogawa K, Miyamoto N, Hatano T, Seo H, Matsui N. (1989) Potentiation of atrial natriuretic peptide-stimulated cyclic guanosine monophosphate formation by glucocorticoids in cultured rat renal cells *Br J Pharmacol.*; 96(4):795-800.
- Kang SM, Jang Y, Kim JY, Chung N, Cho SY, Chae JS, Lee JH. (2002) Effect of oral administration of testosterone on brachial arterial vasoreactivity in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* ;89(7): 862-864.
- Kato T, Iwama Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. (1990) Prostaglandin H2 may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension.* ; 15(5):475-481.

- Kawahara S, Umemoto S, Tanaka M, Umeji K, Matsuda S, Kubo M, Matsuzaki M. (2005) Up-regulation of Akt and eNOS induces vascular smooth muscle cell differentiation in hypertension in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol.*; 45(4):367-374.
- Kawasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K. (1998) Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature*; 335(6186):164-167.
- Khalil RA, Morgan KG (1993) PKC-mediated redistribution of mitogen-activated protein kinase during smooth muscle cell activation. *Am J Physiol.* 265(2 Pt 1):C406-411.
- Kim-Schulze S, McGowan KA, Hubchak SC, Cid MC, Martin MB, Kleinman HK, Greene GL, Schnaper HW (1996) Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation.* 94(6):1402-1407.
- Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T. (1989) Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.*; 159(2):548-553.
- Kon V, Badr KF. (1991) Biological actions and pathophysiologic significance of endothelin in the kidney. *Kidney Int.* 40(1):1-12.
- Kukkonen JP, Renvaktar A, Shariatmadari R, Akerman KE (1998) Ligand- and subtype-selective coupling of human α -2 adrenoceptors to Ca^{++} elevation in Chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 287 (2): 667-671.
- Kung CF, Luscher TF. (1995) Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension.*; 25(2):194-200.
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. (1992) Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14):6348-6352.
- Lancaster JR. (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17):8137-8141.
- Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D (1992) Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 267(36):25934-25938.
- Lee YH, Kim I, Laporte R, Walsh MP, Morgan KG (1999) Isozyme-specific inhibitors of protein kinase C translocation: effects on contractility of single permeabilized vascular muscle cells of the ferret. *J Physiol.* 517 (Pt 3):709-720.
- Levin ER. (1995) Endothelins. *N Engl J Med.*; 333(6):356-363.
- Levy M, Sabry S, Mercier JC, Dinh-Xuan AT. (1997) Roles of vasoactive factors synthesized by endothelium in pulmonary arterial hypertension *Arch Pediatr.*; 4(3):271-277.
- Li H, Hergert SM, Schafer SC, Brausch I, Yao Y, Huang Q, Mang C, Lehr HA, Forstermann U. (2005) Midostaurin upregulates eNOS gene expression and preserves eNOS function in the microcirculation of the mouse. *Nitric Oxide*; 12: 231-236.

- Li H, Oehrlein SA, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfart P, Ulshofer T, Jessen T, Herget T, Forstermann U, Kleinert H. (1998) Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol*; 53: 630-637.
- Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. (2004) Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J Biol Chem.*; 279(17):16939-16946.
- Li J, Li W, Altura BT, Altura BM. (2004) Peroxynitrite-induced relaxation in isolated canine cerebral arteries and mechanisms of action. *Toxicol Appl Pharmacol.*; 196(1):176-182.
- Li K, Zhang J, Sirois P, Hu Y. (1999) Technology evaluation: ISIS-3521. *Curr Opin Mol Ther*; 1(3):393-398.
- Li YJ, Duckles SP (1992) Effect of endothelium on the actions of sympathetic and sensory nerves in the perfused rat mesentery. *Eur J Pharmacol.* 210(1):23-30.
- Li YJ, Zhun H, Stransbury KH, Trush MA (1997) Oxygen Radicals an Disease process. *Amsterdam: Harwood Academic* p. 327-377
- Limbird LE (1988) Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *FASEB J.* 2 (11): 2686-2695.
- Liou YM, Morgan KG (1994) Redistribution of protein kinase C isoforms in association with vascular hypertrophy of rat aorta. *Am J Physiol.* 267(4 Pt 1):C980-989.
- Liu D, Dillon JS. (2002) Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3) *J Biol Chem.*; 277(24):21379-21388.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-275.
- Lu Q, Ebling H, Mittler J, Baur WE, Karas RH (2002) MAP kinase mediates growth factor-induced nuclear translocation of estrogen receptor alpha. *FEBS Lett.* 516(1-3):1-8.
- Lundberg JM, Tatemoto K (1982) Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. *Acta Physiol Scand.* 116 (4):393-402.
- Lüscher TF, Vanhoutte PM. (1986) Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.*; 8(4):344-348.
- Lüscher TF, Vanhoutte PM. (1990) The endothelium: Modulator of cardiovascular function *Boca Raton, FL: CRC Press*: 1-215.
- Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. (1992) Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem.* 267(9):6370-6374.
- MacNulty EE, McClue SJ, Carr IC, Jess T, Wakelam MJ, Milligan G (1992) Alpha 2-C10 adrenergic receptors expressed in rat 1 fibroblasts can regulate both adenylylcyclase and phospholipase D-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine by interacting with pertussic toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem.* 267 (4): 21490-2156.

- Maeso R, Rodrigo E, Muñoz-García R, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Cachofeiro V, Lahera V. (1998) Chronic treatment with losartan ameliorates vascular dysfunction induced by aging in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*; 16(5):665-672.
- Maggi CA, Meli A. (1988) The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol.*; 19 (1): 1-43.
- Maier JA, Hla T, Maciag T (1990) Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 265(19):10805-10808.
- Manabe K, Shirahase H, Usui H, Kurahashi K, Fujiwara M. (1989) Endothelium-dependent contractions induced by angiotensin I and angiotensin II in canine cerebral artery. *J Pharmacol Exp Ther.*; 251(1):317-320.
- Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, Riendeau D (2000) Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem.* 276(6):4469-4475.
- Marín J, Balfagón G (1998) Effect of clenbuterol on non-endothelial nitric oxide release in rat mesenteric arteries and the involvement of beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol*; 124(3):473-478.
- Marín J, Ferrer M, Balfagón G. (2000) Role of protein kinase C in electrical-stimulation-induced neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*; 99(4):277-283.
- Marletta MA. (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268(17):12231-12234.
- Martin MC, Balfagón G, Minoves N, Blanco-Rivero J, Ferrer M. (2005) Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its vasodilator effect in rat mesenteric arteries. *Nitric Oxide.*;12(3):163-176.
- Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, Schachtele C (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem.* 268(13):9194-9197.
- Massheimer V, Polini N, Alvarez C, Benozzi S, Selles J. (2002) 17Beta-estradiol rapid stimulation of rat aorta NOS activity is prevented by oestrogen deficiency. *Maturitas.*; 43(1):55-64.
- Matz RL, de Sotomayor MA, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. (2000) Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol*; 131(2):303-311.
- Mayeux PR, Mais DE, Carr C, Halushka PV (1989) Human erythroleukemia cells express functional thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 250(3):923-927.
- McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF (1999) Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 34(4 Pt 1):539-545.

- McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN, Kontos HA. (1999) Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke*; 30: 2186-2190.
- Mellor H, Parker PJ (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* 332 (Pt 2):281-292.
- Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P (1988) Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) *J Biol Chem.* 263(8):3550-3553.
- Michel T, Feron O. (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.* 100(9):2146-2152.
- Miethke A, Feussner M, Planitzer G, Richter H, Gutschmann M, Gossrau R. (2003) Localization of NOS-1 in the sarcolemma region of a subpopulation of atrial cardiomyocytes including myoendocrine cells and NOS-3 in vascular and endocardial endothelial cells of the rat heart. *Acta Histochem.*; 105(1):43-55.
- Minneman KP (1988) Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol Rev.* 40(2):87-119.
- Minoves N, Balfagon G, Ferrer M (2002) Role of female sex hormones in neuronal nitric oxide release and metabolism in rat mesenteric arteries. *Clin Sci (Lond)*; 103(3):239-247.
- Mitchell JA, de Nucci G, Warner TD, Vane JR. (1992) Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol.*; 105(2):485-489.
- Mohazzab KM, Wolin MS (1994) Properties of a superoxide anion-generating microsomal NADH oxidoreductase, a potential pulmonary artery PO_2 sensor. *Am J Physiol.* 267(6 Pt 1):L823-831.
- Mombouli JV, Illiano S, Nagao T, Scott-Burden T, Vanhoutte PM. (1992) Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors. *Circ Res.*; 71(1):137-144.
- Moncada S, Erusalimsky JD. (2002) Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3(3):214-220.
- Montalvo L, Sanchez-Chapado M, Prieto JC, Carmena MJ. (2002) Regulation of the expression of protein kinase C isoenzymes in rat ventral prostate: effects of age, castration and flutamide treatment. *Life Sci.*; 71(19):2257-2266.
- Morgan KG, Leinweber BD (1998) PKC-dependent signalling mechanisms in differentiated smooth muscle. *Acta Physiol Scand.* 164(4):495-505.
- Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem.* 270(18):10902-10908.
- Moro MA, Darley-USmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Moncada S. (1994) Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(14):6702-6706.

- Moro MA, Darley-Usmar VM, Lizasoain I, Su Y, Knowles RG, Radomski MW, Moncada S. (1995) The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br J Pharmacol.* 116(3):1999-2004
- Morrow JD, Awad JA, Kato T, Takahashi K, Badr KF, Roberts LJ 2nd, Burk RF. (1992) Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J Clin Invest.* 90(6):2502-2507.
- Morrow JD. (2005) Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 25(2):279-286.
- Mukherjee S, Coaxum SD, Maleque M, Das SK. (2001) Effects of oxidized low density lipoprotein on nitric oxide synthetase and protein kinase C activities in bovine endothelial cells. *Cell Mol Biol*; 47: 1051-1058.
- Murphy JG, Khalil RA (1999) Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther.* 291(1):44-52.
- Murphy JG, Khalil RA (2000) Gender-specific reduction in contractility and $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle cells of female rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 278(4):C834-844.
- Murphy ME, Brayden JE. (1995) Apamin-sensitive K^+ channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *J Physiol.*; 489 (Pt 3):723-734.
- Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F. (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun.*; 180(3):1396-1402.
- Nakao J, Change WC, Murota SI, Orimo H. (1981) Testosterone inhibits prostacyclin production by rat aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis.*; 39(2):203-209.
- Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. (2003) Protein kinase C β inhibition and aorta and corpus cavernosum function in streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol.*; 475(1-3):99-106.
- Narumiya S, FitzGerald GA (2001) Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 108(1):25-30.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.*; 79(4):1193-1226.
- Nava E, Palmer RM, Moncada S. (1991) Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet.* 338(8782-8783):1555-1557.
- Nava E, Salazar FJ. (1997) Comparative effects of nitric oxide synthesis inhibition and catecholamine treatment in a rat model of endotoxin shock. *Eur J Clin Invest.* 27(8):673-679.
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB (1990) Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol.*; 259(1 Pt 1):C3-18.

- Newton AC (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270(48):28495-28498.
- Newton AC (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J.* 370(Pt 2):361-371.
- Nie D, Lamberti M, Zacharek A, Li L, Szekeres K, Tang K, Chen Y, Honn KV. (2000) Thromboxane A(2) regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*; 267(1):245-251.
- Nielsen KC, Owman C (1971) Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.* 27(1):33-42.
- Nishizuka Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.*; 308(5961):693-698.
- Norata GD, Tibolla G, Seccomandi PM, Poletti A, Catapano AL. (2006) Dihydrotestosterone decreases tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab.*; 91(2):546-554..
- Nossuli TO, Hayward R, Scalia R, Lefer AM. (1997) Peroxynitrite reduces myocardial infarct size and preserves coronary endothelium after ischemia and reperfusion in cats. *Circulation.* 96(7):2317-2324.
- Oeckler RA, Wolin MS. (2000) New concepts in vascular nitric oxide signaling. *Curr Atheroscler Rep*; 2(5):437-444.
- Okada D. (1992) Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J Neurochem.*; 59(4):1203-1210.
- Okada D. (1995) Protein kinase C modulates calcium sensitivity of nitric oxide synthase in cerebellar slices. *J Neurochem.*; 64(3):1298-1304.
- Okon EB, Szado T, Laher I, McManus B, van Breemen C. (2003) Augmented contractile response of vascular smooth muscle in a diabetic mouse model. *J Vasc Res.*; 40(6):520-530.
- O'Neill GP, Mancini JA, Kargman S, Yergey J, Kwan MY, Falgout JP, Abramovitz M, Kennedy BP, Ouellet M, Cromlish W, et al (1994) Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccinia virus: inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mol Pharmacol.* 45(2):245-254.
- Onoue S, Endo K, Yajima T, Kashimoto K. (2002) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide regulates the basal production of nitric oxide in PC12 cells. *Life Sci.*; 71(2):205-214.
- Orij G. (2003) Role of metoprolol, B1-adrenoceptor antagonist, thromboxane A2 and nitric oxide in CsA-induced hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 68(3):233-238.
- Orshal JM, Khalil RA (2004) Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286(2):R233-249.

- Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA (1995) An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol.* 268(6 Pt 2):H2274-2280.
- Patocka J, Merka V, Hrdina V, Hrdina R. (2005) Pharmacological potential of endothelin receptors agonists and antagonists. *Acta Medica (Hradec Kralove)*; 48(2):67-73.
- Patscheke H. (1990) Thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor antagonists. A new therapeutic principle. *Stroke.*; 21(12 Suppl):IV139-142.
- Perez-Vizcaino F, Villamor E, Duarte J, Tamargo J. (1997) Involvement of protein kinase C in reduced relaxant responses to the NO/cyclic GMP pathway in piglet pulmonary arteries contracted by the thromboxane A₂-mimetic U46619. *Br J Pharmacol.*; 121(7):1323-1333.
- Perusquia M, Hernandez R, Morales MA, Campos MG, Villalon CM. (1996) Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol.*; 27(1):181-185.
- Perusquia M, Villalon CM. (1999) Possible role of Ca²⁺ channels in the vasodilating effect of 5 β -dihydrotestosterone in rat aorta. *Eur J Pharmacol.*; 371(2-3):169-178.
- Perusquia M. (2003) Androgen-induced vasorelaxation: a potential vascular protective effect. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*; 111: 55-59.
- Peterson, Gary L. (1979) Review of the folin phenol protein quantification method of lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100: 201-220
- Pfeiffer S, Lass A, Schmidt K, Mayer B (2001) Protein tyrosine in mouse peritoneal macrophages activated in vitro and in vivo: Evidence against an essential role of peroxynitrite. *FASEB J* 15; 2355-2364.
- Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T. (1997) Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res.* 81(3):372-379.
- Planitzer G, Richter H, Gossrau R. (2002) The nitric oxide synthase-1 and nitric oxide synthase-3/nitric oxide signalling systems in the heart of wild type mice and mouse mutants. *Histochem J.*; 34(6-7):345-355.
- Polytarchou C, Papadimitriou E. (2005) Antioxidans inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol*; 510: 1-38.
- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 267(34):24173-24176.
- Quan A, Teoh H, Man RY. (1999) Acute exposure to a low level of testosterone impairs relaxation in porcine coronary arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; 26(10):830-832.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. (1990) Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24):10043-10047.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50(3):413-492.

- Rasmussen H, Takuwa Y, Park S. (1987) Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J.* 1(3):177-185.
- Reilly MP, Lawson JA, FitzGerald GA. (1998) Eicosanoids and isoeicosanoids: indices of cellular function and oxidant stress. *J Nutr.*; 128(2 Suppl):434S-438S
- Reynoso R, Mohn C, Retory V, Szwarcfarb B, Carbone S, Rondina D, Moguilevsky JA. (2002) Changes in the effect of testosterone on hypothalamic nitric oxide synthetase during sexual maturation. Its relationship with GnRH release. *Neuro Endocrinol Lett.*; 23(2):101-104.
- Rivero-Vilches FJ, de Frutos S, Saura M, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M (2003) Differential relaxing responses to particulate or soluble guanylyl cyclase activation on endothelial cells: a mechanism dependent on PKG-I alpha activation by NO/cGMP. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285(4):C891-898.
- Rizzoni D. (2002) Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fantasy? *J Hypertens.*; 20(8):1479-1481.
- Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, Cerquetani E, della Monica PL, Bonfigli B, Volpe M, Chierchia SL. (1999) Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation.*; 99(13):1666-1670.
- Rubanyi GM, Botelho LH (1991) Endothelins. *FASEB J.* 5(12):2713-2720.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. (1986a) Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.*; 250(5 Pt 2):H815-H821.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. (1986b) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 250(5 Pt 2):H822-827
- Rubio-Gayosso I, Garcia-Ramirez O, Gutierrez-Serdan R, Guevara-Balcazar G, Muñoz-García O, Morato-Cartajena T, Zamora-Garza M, Ceballos-Reyes G (2002) Testosterone inhibits bradykinin-induced intracellular calcium kinetics in rat aortic endothelial cells in culture. *Steroids* 67(5):393-397.
- Ruffolo RR, Waddell JE, Yaden EL. (1982) Postsynaptic alpha adrenergic receptor subtypes differentiated by yohimbine in tissues from the rat. Existence of alpha-2 adrenergic receptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217, 235-240.
- Salamanca DA, Khalil RA. (2005) Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol.*; 70(11):1537-1547.
- Salom JB, Burguete MC, Perez-Asensio FJ, Torregrosa G, Alborch E. (2001) Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab.*; 21(4):422-429.
- Sánchez-Ferrer CF, Marín J. (1990) Endothelium-derived contractile factors. *Gen Pharmacol*; 21: 589-603.
- Sato A, Sakuma I, Gutterman DD. (2003) Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 285(6):H2345-2354.

- Sausville EA, Arbuck SG, Messmann R, Headlee D, Bauer KS, Lush RM, Murgu A, Figg WD, Lahusen T, Jaken S, Jing X, Roberge M, Fuse E, Kuwabara T, Senderowicz AM. (2001) Phase I trial of 72-hour continuous infusion UCN-01 in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol.*;19(8):2319-2333.
- Schiffrin EL. (2002) Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens.*; 15(10 Pt 2):115S-122S.
- Schmeck B, Brunsch M, Seybold J, Krull M, Eichel-Streiber C, Suttorp N, Hippenstiel S. (2003) Rho protein inhibition blocks cyclooxygenase-2 expression by proinflammatory mediators in endothelial cells. *Inflammation*; 27: 89-95.
- Schorr K, Morinelli TA, Masuda A, Matsuda K, Mathur RS, Halushka PV. (1994) Testosterone treatment enhances thromboxane A2 mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. *Eur J Clin Invest.*; 24 Suppl 1:50-52.
- Schuetz R, LaPointe MC. (2000) Phorbol ester stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostanoid production in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Aug;279(2):H719-725.
- Schulz R, Nava E, Moncada S. (1992) Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 105(3):575-580.
- Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL (2005) Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacology and therapeutics*; 108: 225-256
- Schwaner I, Offermanns S, Spicher K, Seifert R, Schultz G. (1995) Differential activation of Gi and Gs proteins by E- and I-type prostaglandins in membranes from the human erythroleukaemia cell line, HEL. *Biochim Biophys Acta.*; 1265(1):8-14.
- Scordalakes EM, Imwalle DB, Rissman EF (2002) Oestrogen's masculine side: mediation of mating in male mice. *Reproduction.*; 124(3):331-338.
- Scott-Burden T, Vanhoutte PM. (1993) The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*; (87): 51-55.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(25):12013-12017.
- Shang Y, Dluzen DE. (2002) Castration increases nioxetine-evoked norepinephrine levels in vivo within the olfactory bulb of male rats. *Neurosci Lett.*; 328(2):81-84.
- Sheehan M, Wong HR, Hake PW, Malhotra V, O'Connor M, Zingarelli B. (2002) Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol Pharmacol* 61(5):953-963.
- Shen GX. (2003) Selective protein kinase C inhibitors and their applications. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.*; 3(4):301-307.
- Shimokawa H. (1998) Endothelial dysfunction in hypertension. *J Atheroscler Thromb.*; 4(3):118-127.

- Siddhanta U, Wu C, Abu-Soud HM, Zhang J, Ghosh DK, Stuehr DJ. (1996) Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *J Biol Chem* 271(13):7309-7312.
- Siddiqui A, Shah BH. (1997) Neonatal androgen manipulation differentially affects the development of monoamine systems in rat cerebral cortex, amygdala and hypothalamus. *Brain Res Dev Brain Res.*; 98(2):247-252.
- Simoncini T, Genazzani AR. (2003) Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol.*; 148(3):281-292.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR (2003) Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinology* 144(8):3449-3455.
- Singh R, Pervin S, Shryne J, Gorski R, Chaudhuri G. (2000) Castration increases and androgens decrease nitric oxide synthase activity in the brain: physiologic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 97(7):3672-3677.
- Smith CW Pritchard K, Marston SB (1987) The mechanism of Ca^{2+} regulation of vascular smooth muscle thin filaments by caldesmon and calmodulin. *J Biol Chem.* 262(1):116-122.
- Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL (1991) Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther.* 49(3):153-179.
- Somjen D, Kohen F, Jaffe A, Amir-Zaltsman Y, Knoll E, Stern N (1998) Effects of gonadal steroids and their antagonists on DNA synthesis in human vascular cells. *Hypertension* Jul;32(1):39-45.
- Somlyo AP, Somlyo AV (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 2000 522 Pt 2:177-185.
- Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105(12):1429-1435.
- Spitaler M, Cantrell DA. (2004) Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol.*; 5(8):785-790.
- Stone JR, Marletta MA. (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33(18):5636-5640.
- Stone JR, Sands RH, Dunham WR, Marletta MA. (1995) Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 207(2):572-577.
- Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL (1995) The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(11):2032-2036.

- Stuehr DJ (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:339-59.
- Sun C, Chen M, Mao J, Wang X (2001) Biphasic effects of orchidectomy on calcitonin gene-related peptide synthesis and release. *Neuroreport.*; 12(16):3497-3502.
- Surprenant A, Horstman DA, Akbarali H, Limbird LE (1992) A point mutation of the alpha 2-adrenoceptor that blocks coupling to potassium but not calcium currents. *Science.* 257 (5072): 977-980.
- Taddei S, Vanhoutte PM. (1993) Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension.*; 21(1):9-15.
- Takenaga M, Kawasaki H. Neuronal control of mesenteric circulation (1999) *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 113 (4): 249-259.
- Tao J, Tu YT, Li JW, Feng AP, Huang CZ, Wu Y, Shen GX. (2006) Endogenous production of nitric oxide contributes to proliferation effect of vascular endothelial growth factor-induced malignant melanoma cell. *Clin Exp Dermatol.*; 31(1):94-99.
- Tatchum-Talom R, Eyster KM, Martin DS. (2005) Sexual dimorphism in angiotensin II-induced hypertension and vascular alterations. *Can J Physiol Pharmacol*; 83(5):413-422.
- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V (1982) Neuropeptide Y a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature.* 296 (5858): 659-660.
- Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY.(2000b) Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol.*; 129(7):1301-1308.
- Teoh H, Quan A, Man RY. (2000a) Acute impairment of relaxation by low levels of testosterone in porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res.*; 45(4):1010-1018.
- Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. (2002) Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol.*; 135(3):735-740.
- Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. (2003) Mechanisms of vasolaxation to testosterone in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*; 465: 125-132.
- Thakor AS, Giussani DA. (2005) Role of nitric oxide in mediating in vivo vascular responses to calcitonin gene-related peptide in essential and peripheral circulations in the fetus. *Circulation.*; 112(16):2510-2516.
- Thavasu P, Propper D, McDonald A, Dobbs N, Ganesan T, Talbot D, Braybrook J, Caponigro F, Hutchison C, Twelves C, Man A, Fabbro D, Harris A, Balkwill F. (1999) The protein kinase C inhibitor CGP41251 suppresses cytokine release and extracellular signal-regulated kinase 2 expression in cancer patients. *Cancer Res.*; 59(16):3980-3984.
- Thompson J, Khalil RA. (2003) Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 30(1-2):1-15
- Thompson LP, Pinkas G, Weiner CP (2000) Chronic 17beta-estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation. *Circulation.* 102(4):445-451.

- Timmermans PB, Chiu AT, Thoolen MJ (1987). Calcium handling in vasoconstriction to stimulation of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. *Can J Physiol Pharmacol.* 65(8):1649-1657.
- Tostes RC, David FL, Carvalho MH, Nigro D, Scivoletto R, Fortes ZB (2000) Gender differences in vascular reactivity to endothelin-1 in deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 36(5 Suppl 1):S99-101.
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.* 90(11):1205-1213.
- Tracey WR, Nakane M, Basha F, Carter G. (1995) In vivo pharmacological evaluation of two novel type II (inducible) nitric oxide synthase inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol.*; 73(5):665-669.
- Traylor TG, Sharma VS. (1992) Why NO? *Biochemistry* 31(11):2847-2849.
- Trist DG, Collins BA, Wood J, Kelly MG, Robertson AD (1989) The antagonism by BW A868C of PGD2 and BW245C activation of human platelet adenylate cyclase. *Br J Pharmacol.* 96(2):301-306.
- Tsukamoto O, Asanuma H, Kim J, Minamino T, Takashima S, Ogai A, Hirata A, Fujita M, Shinozaki Y, Mori H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. (2005) A role of opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning via activation of protein kinase C in the canine heart *Biochem Biophys Res Commun.* 23;338(3):1460-1466.
- Turner NA, Walker JH, Ball SG, Vaughan PF. (1996) Phorbol ester-enhanced noradrenaline secretion correlates with the presence and activity of protein kinase C-alpha in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem.*; 66(6):2381-2389.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:97-120
- Vanhoutte PM, Verbeuren TJ, Webb RC. (1981) Local modulation of adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Physiol Rev.*; 61(1):151-247.
- Vanhoutte PM. (1996) Endothelium-dependent responses in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 28: 2233-2240.
- Vazquez-Perez S, Navarro-Cid J, de las Heras N, Cediell E, Sanz-Rosa D, Ruilope LM, Cachafeiro V, Lahera V. (2001) Relevance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the effects of hypertension on rat coronary relaxations. *J Hypertens.*; 19(3 Pt 2):539-545.
- Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovich V, Fellin R, Malinski T. (2000) Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability. *Circulation* 101(11):1261-1266.

- Virchis A, Ganeshaguru K, Hart S, Jones D, Fletcher L, Wright F, Wickremasinghe R, Man A, Csermak K, Meyer T, Fabbro D, Champain K, Yap A, Prentice HG, Mehta A (2002) A novel treatment approach for low grade lymphoproliferative disorders using PKC412 (CGP41251), an inhibitor of protein kinase C. *Hematol J.*; 3(3):131-136.
- Vrolix M, Raeymaekers L, Wuytack F, Hofmann F, Casteels R. (1988) Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasmalemmal Ca^{2+} pump of smooth muscle via phosphorylation of phosphatidylinositol. *Biochem J* 255(3):855-863.
- Wakasugi M, Noguchi T, Kazama YI, Kanemaru Y, Onaya T. (1989) The effects of sex hormones on the synthesis of prostacyclin (PGI₂) by vascular tissues. *Prostaglandins.*; 37(4):401-410.
- Waldman HM, Alter I, Kot PA, Rose JC, Ramwell PW. (1978) Effect of lung transit on systemic depressor responses to arachidonic acid and prostacyclin in dogs. *J Pharmacol Exp Ther.*; 204(2):289-293.
- Walsh MP, Horowitz A, Clement-Chomienne O, Andrea JE, Allen BG, Morgan KG (1996) Protein kinase C mediation of Ca^{2+} -independent contractions of vascular smooth muscle. *Biochem Cell Biol.* 74(4):485-502.
- Wang D, Hope S, Du Y (1999) Paracrine role of adventitial superoxide anion in a model of genetic hypertension. Role of endothelium. *Hypertension* 33, 1353-1358
- Wang X, Zhang J, Berkowski SM, Knowleg H, Chandramouly AB, Downens M, Prystowsky MB. (2004) Protein kinase C-mediated phosphorylation of Kv beta 2 in adult rat brain. *Neurochem Res.*; 29(10):1879-1886.
- Ward JP, Knock GA, Snetkov VA, Aaronson PI. (2004) Protein kinases in vascular smooth muscle tone-role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pharmacol Ther.* 104(3):207-231.
- Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, Narumiya S, Ichikawa A (1993) Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem.* 268(27):20175-20178.
- Watanabe T, Yatomi Y, Sunaga S, Miki I, Ishii A, Nakao A, Higashihara M, Seyama Y, Ogura M, Saito H, et al (1991) Characterization of prostaglandin and thromboxane receptors expressed on a megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01s. *Blood* 78(9):2328-2336.
- Wedgwood S, Bekker JM, Black SM. (2001) Shear stress regulation of endothelial NOS in fetal pulmonary arterial endothelial cells involves PKC. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 281: L490-498.
- Wei EP, Kontos HA, Beckman JS. (1996) Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol.*; 271(3 Pt 2):H1262-H1266.
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. (1994) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 91(11):5212-5216.
- Werstiuk ES, Lee RM (2000) Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can J Physiol Pharmacol.* 78 (6): 433-452.

- Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ. (1997) Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 237(2):340-344.
- Wiklund NP, Leone AM, Gustafsson LE, Moncada S (1993) Release of nitric oxide evoked by nerve stimulation in guinea-pig intestine. *Neuroscience*. 53(3):607-611.
- Williams SP, Dorn GW 2nd, Rapoport RM. (1994) Prostaglandin I₂ mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.*; 267(2 Pt 2):H796-803.
- Wimalawansa, SJ. (1996) Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev.* ; 17 (5): 533-585.
- Wingard DL, Suarez L, Barrett-Connor E. (1983) The sex differential in mortality from all causes and ischemic heart disease. *Am J Epidemiol.*; 117(2):165-172.
- Wise A, Watson-Koken MA, Rees S, Lee M, Milligan G (1997) Interactions of the alpha_{2A}-adrenoceptor with multiple Gi-family G-proteins: studies with pertussis toxin-resistant G-protein mutants. *Biochem J.* 321 (Pt 3): 721-728.
- Wolin MS, Burke-Wolin TM, Mohazzab KM. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms (1999) *Respir Physiol.* 115(2):229-238.
- Won E, Won J, Kwon S, Lee Y, Nam T, Ahn D. (2003) Testosterone causes simultaneous decrease of [Ca²⁺]_i and tension in rabbit coronary arteries: by opening voltage dependent potassium channels. *Yonsei Med J.*; 44(6):1027-1033.
- Wong CI, Zhou ZX, Sar M, Wilson EM. (1993) Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH₂-terminal and steroid-binding domains. *J Biol Chem.*; 268(25):19004-19012.
- Wood J, Garthwaite J. (1994) Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 33(11):1235-1244.
- Wu M, Pritchard KA Jr, Kaminski PM, Fayngersh RP, Hintze TH, Wolin MS. (1994) Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am J Physiol*; 266(5 Pt 2):H2108-2113.
- Wynne FL, Khalil RA (2003) Testosterone and coronary vascular tone: implications in coronary artery disease. *J Endocrinol Invest.* 26(2):181-186.
- Xia Y, Zweier JL. (1997) Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(23):12705-12710.
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256(5054):225-228.
- Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2):657-662.
- Yakubu MA, Sofola OA, Igbo I, Oyekan AO. (2004) Link between free radicals and protein kinase C in glucose-induced alteration of vascular dilation. *Life Sci*; 75: 2921-2932.

- Yanagisawa M, Masaki T. (1989) Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem Pharmacol.*; 38(12):1877-1883.
- Yorek MA, Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Bing X, Lund DD, Dillon JS (2002) Effect of treatment of diabetic rats with dehydroepiandrosterone on vascular and neural function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 283(5):E1067-1075.
- Yoshida K, Okamura T, Toda N (1994) Histological and functional studies on the nitroxidergic nerve innervating monkey cerebral, mesenteric and temporal arteries. *Jpn J Pharmacol.* 65 (4): 351-359.
- Yuan XJ (1995) Voltage-gated K⁺ currents regulate resting membrane potential and [Ca²⁺]_i in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res.*; 77(2):370-378.
- Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P (1995) Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation.* 91(4):1154-1160.
- Zhang F, Ram JL, Standley PR, Sowers JR (1994) 17 beta-Estradiol attenuates voltage-dependent Ca²⁺ currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol.* 266(4 Pt 1):C975-980.
- Zhang YC, Ni W, Zhang ZK, Xu YJ. (2004) The effect of protein kinase C on voltage-gated potassium channel in pulmonary artery smooth muscle cells from rats exposed to chronic hypoxia. *Chin Med J (Engl)*; 117(1):19-23.
- Zhang Z, Naughton D, Winyard PG, Benjamin N, Blake DR, Symons MC. (1998) Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun.*; 249(3):767-772.
- Zhong H, Minneman KP (1999) Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 375 (1-3): 261-276.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. (2002) High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H₂ receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes.* 51(1):198-203.

Libros

- Guyton AC, Hall JE (2006) Medical Physiology, 11th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Mathews C, Van Holde K, Ahern K (2000) Biochemistry (3rd edition)
- Randall D, Burggren W, French K (2001) Eckert Animal Physiology, mechanisms and adaptations (5th edition)
- Tresguerres JAF, Aguilar E, Cachafeiro V, Cardinali D, Gil P, Lahera V, Mora F, Rodríguez R, Romano M, Tamargo J, Zarco P (1999) Fisiología humana (2^a edición), McGraw-Hill Interamericana.

En Internet:

- <http://www.fisterra.com>
- <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

